

BESTIMMUNG DER ANTIKÖRPER-ISOTYPEN
BEI UM B19 HÜHNERN
NACH IMMUNISIERUNG MIT BORDETELLA
PERTUSSIS, BRUCELLA ABORTUS
UND HUMANSERUMALBUMIN

Emil Dura

1903



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554013_0037

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. U. Lösch

BESTIMMUNG DER ANTIKÖRPER-ISOTYPEN BEI UM B19
HÜHNERN NACH IMMUNISIERUNG MIT BORDETELLA PERTUSSIS,
BRUCELLA ABORTUS UND HUMANSERUMALBUMIN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
EMIL DURA
aus
Rotthof

München 1983

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Universität München

Dekan: Prof. Dr. G. Terplan

Referent Prof. Dr. U. Lösch

Korreferent: Prof. Dr. H. G. Buschmann

Tag der Promotion: 25. Februar 1983



Abkürzungsverzeichnis

Ig	Immunglobulin
AK	Antikörper
FCA	Freund's complete adjuvant
RID	Radiale Immundiffusion
ME	Merkaptoäthanol
B.pertussis	Bordetella pertussis
B.abortus	Brucella abortus
HSA	Humanserumalbumin
KO	Kontrollen
DYS, dysg.	dysgammaglobulinämisch
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
A-AK	Antikörper der Immunglobulinklasse A
G-AK	Antikörper der Immunglobulinklasse G
M-AK	Antikörper der Immunglobulinklasse M

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Literatur
 - 1.1. Einleitung
 - 1.2. Literatur
2. Material und Methoden
 - 2.1. Tiermaterial
 - 2.2. Adjuvans und Antigene
 - 2.2.1. Komplettes Freundsches Adjuvans
 - 2.2.2. Bordetella pertussis
 - 2.2.3. Brucella abortus
 - 2.2.4. Humanserumalbumin
 - 2.3. Immunelektrophorese
 - 2.4. Proteinbestimmung
 - 2.4.1. Methode nach Bradford
 - 2.4.2. Extinktionsmessung bei 280 nm
 - 2.5. Affinitätschromatographie an Sepharose 4B
 - 2.6. Einfache radiale Immundiffusion
 - 2.7. Agglutinationstiterbestimmung
 - 2.7.1. 2-Merkaptoäthanolbehandlung
 - 2.7.2. Passive Hämagglutination
 - 2.7.3. Direkte Agglutination
 - 2.8. Versuchsablauf
3. Ergebnisse
 - 3.1. Immunglobulin- und Antikörperserumspiegel nach Immunisierung mit B.pertussis, B.abortus und HSA, ohne bzw. mit zusätzlicher FCA-Gabe

- 3.2. Vergleich der Immunglobulin- bzw. Antikörper-
serumspiegel ab dem 28. Tag nach Immunisierung
mit B.pertussis, B.abortus und HSA, ohne bzw.
mit zusätzlicher FCA-Gabe
- 3.3. Vergleich der Antigene B.pertussis, B.abortus
und HSA, hinsichtlich ihrer Immunogenität, mit
und ohne Adjuvansgabe
- 3.4. Untersuchung zum Memoryeffekt bei Hühnern nach
Immunisierung mit HSA und B.abortus
- 3.4.1. Memoryeffekt nach HSA-Applikation
- 3.4.2. Memoryeffekt nach B.abortus-Applikation
4. Diskussion
- 4.1. Besprechung der Methoden
- 4.2. Besprechung der Ergebnisse
5. Zusammenfassung
6. Summary
7. Literaturverzeichnis

1. Einleitung und Literatur

1.1. Einleitung

Untersuchungen über den Adjuvanseffekt von Freundschem kompletten Adjuvans (FCA) führten bei dysgammaglobulinämischen UM B19 Hühnern zu hochgradig von der Norm abweichenden Ergebnissen. Es wurden u.a. nur eine minimale (STARKER (28)) bzw. eine fehlende (KLUMPNER (16) und WÄNKE (35)) Aktivierung der IgG-Synthese und nach Immunisierung mit *Brucella abortus*, statt einer IgG-, eine IgA-Antikörperbildung festgestellt (LÖSCH et al. (20)).

Diese Befunde lenkten unser Interesse auf die Bestimmung des Anteils des spezifischen Antikörperproteins der drei beim Huhn bekannten Ig-Isotypen (IgA, IgG und IgM) am Immunglobulinprotein der jeweils entsprechenden Immunglobulinklasse.

Die vorliegende Arbeit sollte zur Beantwortung folgender Fragen dienen:

1. Wie groß ist der Anteil des Antikörperproteins am Immunglobulinprotein nach Immunisierung mit *B.pertussis*, *B.abortus* und Humanserumalbumin?
2. Wie wirkt sich zusätzliche Adjuvansgabe bei den zellulären Antigenen, *B.pertussis* bzw. *B.abortus*, und dem löslichen Proteinantigen Humanserumalbumin aus?
3. Wie unterscheiden sich die drei eingesetzten Antigene

bezüglich ihrer Potenz zur Anregung der Antikörpersynthese?

4. Zeigen Hühner nach Immunisierung mit Humanserumalbumin bzw. mit B.abortus einen Memoryeffekt?

1.2. Literatur

Brucellen, wie zum Beispiel B.abortus, gelten als T-zell-unabhängige Antigene (23). Als Grund für die T-Unabhängigkeit geben COUTINHO und MÖLLER (8) die Struktur der Moleküle an, die durch sich ständig wiederholende Determinanten gekennzeichnet sind. Es können deshalb vielfach Interaktionen mit den Ig-Rezeptoren auf den B-Zellen vorstatten gehen, im Gegensatz zu den T-abhängigen Antigenen, die zur Bindung mit B-Zellen eine T-Zellvermittlung benötigen. Die sich wiederholenden Determinanten sind, laut WAKSMAN (34), auch die Ursache für die mitogenen Eigenschaften der T-unabhängigen Antigene, die sich in einer unspezifischen B-Zellstimulierung zur Teilung und zur gesteigerten polyklonalen Antikörpersynthese ausdrückt. Die mitogenen Eigenschaften schließen die mögliche Induktion einer antigenspezifischen Immunantwort gegen die präsentierten Antigen determinanten nicht aus.

In der Zellwand der Brucellen sitzen, als Antigen determinanten, Lipoproteine, die, wie MYERS und SINIUK (23) beschreiben, in drei Fraktionen aufzutrennen sind. DIAZ und JONES (10) beschreiben als Hauptantigenkomplex ein Lipopolysaccharid-Protein.

Da DROEGE und MALCHOW (12) feststellten, daß B.abortus nur dosisabhängig als T-zellunabhängig anzusprechen ist, wurde als zweites zelluläres Antigen B.pertussis verwendet. Von B.pertussis ist T-Zellunabhängigkeit (33) sicher bekannt. Es kommt selbst als Adjuvans zum Einsatz und zwar, laut DRESSER und PHILLIPS (11), als Adjuvans mit B-Zellorientierung.

Das lösliche Proteinantigen Humanserumalbumin (HSA) ist beim Huhn als T-zellabhängiges Antigen (6) bekannt.

WHITE (36) untersuchte die Antikörperproduktion bei Hühnern nach Immunisierung mit HSA bei verschiedenen Dosierungen und zusammen mit verschiedenen Adjuvantien. Bei der Applikation von 40 mg HSA i.m. stellte er 10 Tage nach Immunisierung einen Peak der Antikörperspiegel fest, der zum größten Teil aus IgG-Antikörpern besteht. Eine Dosiserniedrigung verschiebt den Hauptanteil der Ig-Klassen am Antikörper vom IgG zum IgM. Eine zusätzliche FCA-Gabe kann diesen ersten Peak nicht beeinflussen, bewirkt aber ein Ansteigen der Antikörperproduktion zu einem zweiten, weit höheren Peak 50 Tage nach Immunisierung.

ROSENBERG und CHILLER (26) finden in ihren Untersuchungen, daß die Aktivierung von AFC (spezifische Antikörper produzierende Zellen) und von IgFC (unspezifisches Ig produzierende Zellen) eng miteinander verbunden ist, obwohl die Kinetik beider Antworten voneinander abweicht. Weiterhin finden sie, daß die Vermehrung von IgFC kein generelles Merkmal der Immunantwort nach Immunisierung

mit jedem beliebigen Antigen ist. FCA als Adjuvans kann die Zahl der IgFC steigern und verstärkt die spezifische Antikörperproduktion T-abhängiger Antigene.

Bei dysgammaglobulinämischen Hühnern untersuchte STARKER (28) den Verlauf der Immunglobulinkonzentration nach Sensibilisierung mit FCA. Er fand einen minimalen IgG-Anstieg und einen hochgradigen Anstieg des IgM. WANKE (35) untersuchte bei diesen Tieren den Einfluß von FCA auf die Immunisierung mit Humanserumalbumin und *Brucella abortus* im Immunglobulin- sowie im Antikörperbereich. Er zeigte, daß der Effekt sowohl von *B.abortus* als auch von FCA auf den Immunglobulinspiegel ein ähnliches Reaktionsmuster aufweist. Im Antikörperbereich konnte er mit der Immunisierung mit HSA die Ergebnisse von STEINBERG et al. (29) bestätigen. Die von ihm durchgeführte Antikörpertiterbestimmung, mittels Agglutination, erlaubt allerdings keine Abschätzung des Antikörperprotein-Immunglobulinproteinverhältnisses und keine Unterscheidung zwischen G- und A-Antikörpern.

NAGASE et al. (24) untersuchten die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses nach Gabe von bovinem Serumalbumin (BSA) bei Hühnern. Sie fanden, daß BSA eine relativ hohe Primärantwort induziert, jedoch kein Gedächtnis für eine Sekundärantwort schafft. BSA + FCA kann eine Gedächtnisbildung bewirken. Wiederholte Injektionen von BSA alleine zeigten einen ähnlichen Effekt. NAGASE et al. kommen deshalb zu dem Schluß, daß bei Hühnern eine kontinuierliche Antigenstimulierung für die Gefi-

nitive Ausbildung eines Gedächtnisses notwendig ist.

Im folgenden sollen die hier angesprochenen Probleme, gemäß den unter 1.1. aufgeführten Fragestellungen, untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Tiermaterial

Als Versuchstiere dienten

1. genuin dysgammaglobulinämische Hühner aus der UM B19 Linie (13) mit dem Genotyp $B^{19}B^{19}$. Sie weisen erhöhte IgM- und IgA-, jedoch sehr niedrige IgG-Konzentrationen, auf.

2. normogammaglobulinämische Hühner der UM B19 Linie mit normalen IgG- und IgM- sowie normalen bzw. leicht erhöhten IgA-Konzentrationen.

3. immunologisch intakte, nicht B-typisierte Kontrollhühner der Legenennenrasse.

Die Tiere waren zu Beginn der Untersuchung mindestens sieben Wochen alt. Sie wurden unter identischen Bedingungen aufgezogen. Die Haltung erfolgte in kleinen Tiergruppen auf Gitterrosten. Pelletiertes Legenhennenalleinfutter und Wasser standen ad libitum zur Verfügung.

2.2. Adjuvans und Antigene

2.2.1. Komplettes Freundsches Adjuvans (FCA)

Als Adjuvans diente komplettes Freundsches Adjuvans (FCA) von der Firma Difco, das pro ml 0.5 mg abgetötete Mykobakterien (*Mc.butyricum*) enthielt. Für die Immunisierung mit FCA wurde die jeweilige Antigenlösung demselben Volumen FCA zugemischt und mittels Ultraschallbehandlung gleichmäßig emulgiert. Die Dosierung erfolgte so, daß pro kg Körpergewicht 1 ml FCA injiziert wurde.

2.2.2. Bordetella pertussis (B.pertussis)

Das Antigen wurde freundlicherweise von Dr. Ivanyi von den Wellcome Research Laboratories/England zur Verfügung gestellt und kam, wie auch die beiden übrigen Antigene bei der Immunisierung, der Agglutinationstiterbestimmung und der Affinitätschromatographie zum Einsatz.

Die Immunisierungsdosis betrug 1 mg/kg Körpergewicht, bei einer Konzentration 1 mg/ml. Die Applikation erfolgte i.m. auf zwei Stellen in den M.pectoralis.

2.2.3. Brucella abortus (B.abortus)

Zum Einsatz kam die, vom Robert-von Ostertag-Institut des Bundesgesundheitsamtes Berlin zur Verfügung gestellte, Brucella-Testflüssigkeit B.abortus Biotyp I Stamm 1119-3, USDA, S-Form. In den Versuchsreihen zum FCA-Effekt wurden als Immunisierungsdosis 10^{10} Brucellen/kg in einer Kon-

zentration von 10^{10} Organismen/ml verwendet. Bei der Untersuchung des Memoryeffekts wurden Dosierungen von 10^9 , 10^7 und 10^5 Brucellen/kg gewählt. Die Applikation erfolgte i.m. oder i.p. .

2.2.4. Humanserumalbumin (HSA)

Zum Einsatz kam das, bei den Behring Werken Mahrburg/Lahn erhältliche, Human Albumin^R. In den Versuchsreihen zum FCA-Effekt betrug die Immunisierungs-dosis 40 mg HSA/kg in einer Konzentration von 40 mg/ml. Als Lösungsmittel diente Ringerlösung¹⁾. Bei der Untersuchung des Memoryeffekts wurden Dosen von 40 mg HSA/kg und 100 µg/kg verwendet. Das Antigen wurde i.m., i.p. oder i.v. appliziert.

2.3. Immunelektrophorese

Die Immunelektrophorese in der Modifikation nach SCHEIDEGGER (27) diente zur Einschätzung der Serum-Ig-Konzentrationen und damit zur Kennzeichnung der normo- und dysgammaglobulinämischen, sowie der transitorischen Versuchstiere (19). Die transitorischen Tiere wurden nicht in die Untersuchung einbezogen.

1) Ringerlösung:

NaCl	8.30 g
KCl	0.30 g
CaCl ₂	0.33 g
aqua dest. ²	ad 1000 ml

2.4. Proteinbestimmung

2.4.1. Methode nach Bradford

Diese photometrische Methode wurde zur Bestimmung des Gesamtproteins im Serum verwandt. Dazu wurde mit verschiedenen Konzentrationen von HSA (0.2 mg/ml bis 1.2 mg/ml) eine Eichkurve erstellt. Die einzelnen Serumproben wurden 1:100 verdünnt, um in den Meßbereich des Photometers zu gelangen, und anschließend auf ihren Proteingehalt hin untersucht.

Bradford-Reagenz: 150 mg Coomassieblue G 250
 50 ml EtOH (96 %)
 50 ml H₃PO₄ (85 %)
 ad 1000 ml aqua bidest.

Meßansatz: Zu 0.1 ml Probe werden 5 ml des Reagenz gegeben und nach 10 min (max 60 min) bei 595 nm im Photometer gegen den Leerwert gemessen. Die Blaufärbung der Lösung ist das Maß für den Proteingehalt der Probe.

2.4.2. Extinktionsmessung bei 280 nm

Gegenüber der Methode nach Bradford hat diese Art der Proteinbestimmung den Vorteil, daß die Probe durch den Meßvorgang nicht verbraucht wird. LESLIE (18) bestimmte den Extinktionskoeffizienten als nahe 13 für alle Immunglobulinklassen beim Huhn (1 g/100 ml Ig $\approx$ 13 Ext.). Mit dieser Methode wurde der Proteingehalt der 3 Ig-Standards für die radiale Immundiffusion und der Eluate, mit den Antikörpern nach der Affinitätschromatographie, bestimmt.

2.5. Affinitätschromatographie an Sepharose 4 B

Mit Hilfe dieser Methode wurden die Antikörper in Reinform aus den einzelnen Serumproben gewonnen. Beim Durchlauf einer Serumprobe bei pH 7.0 setzen sich Antikörper mit ihren Bindungsstellen auf die an die Säule gekoppelten Antigene; nachfolgend werden die Antikörper (aller Isotypen) mit einem Elutionspuffer bei pH 2.5 eluiert. Zum Herstellen einer Säule ist es zunächst notwendig Antigen, in einer zur Kopplung an die Sepharose geeigneter Form, zu gewinnen. HSA, als lösliches Antigen, bedarf keiner vorbereitenden Behandlung. Die B.pertussis- bzw. B.abortus-Antigene dagegen müssen aus der Bakterientrockenmasse, nach der Methode von MYERS (9), gewonnen werden. Nach Zertrümmern mit Ultraschall, Suspendieren der Zellwandtrümmer in 0.5 %igem Tween 80 und Zentrifugieren bei 15000 g enthält der opaleszierende Überstand das Antigen. Dieses Antigen wird, nach den Vorschriften von Pharmacia, Uppsala (25), an CNBr aktivierte Sepharose 4 B gekoppelt. Um ein Säulenvolumen von 10 ml zu erhalten, wäscht man 3.5 g Sepharose-Trockensubstanz in 700 ml 0.001 molarer HCl, um die Sepharosekügelchen zum Quellen zu bringen.

Im anschließenden Kopplungsvorgang wird bei pH 8.3 eine angemessene Antigenmenge, etwa 50-100 mg bei 10 ml Säulenvolumen, an die Sepharosebindungsstellen gebunden. Die Behandlung mit 0.2 molarem Glycin dient zum Inaktivieren der unbesetzt gebliebenen Proteinbindungsstellen der Sepharose. Die Säule ist nun bereit, beim Durchlauf eines

gegen Startpuffer dialysierten Serums, die antigenspezifischen Antikörper zu binden und in einem gesonderten Elutionsvorgang in Reinform wieder abzugeben.

Kopplungspuffer 0.2 molar pH 8.3

5.6 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$
 15.0 g NaHCO_3
 29.2 g NaCl
 ad 1000 ml Aqua dest.

Startpuffer 0.1 molar pH 7.0

5.6 g KH_2PO_4
 21.0 g Na_2HPO_4
 14.6 g NaCl
 0.2 g NaN_3
 5.0 ml Tween 80 100 %ig
 ad 1000 ml Aqua dest.

Glycin 0.2 molar pH 8.0

15.0 g Glycin
 ad 1000 ml Aqua dest.

Elutionspuffer 0.1 molar pH 2.5

7.5 g Glycin
 29.2 g NaCl
 ad 1000 ml Aqua dest.

Acetatpuffer 0.1 molar pH 4.0

1.36 g CH_3CONa
 834 ml 0.1 n CH_3COOH
 29.2 g NaCl
 ad 1000 ml Aqua dest.

Tris-HCl-Puffer 0.2 molar pH 8.5

6.05 g	Tris
29.2 g	NaCl
15.0 ml	HCl 37 %ig
ad 1000 ml	Aqua dest.

Die letzten beiden Puffer wurden zusammen mit Startpuffer zum Regenerieren der Säule nach 4-6 Läufen benötigt.

2.6. Einfache radiale Immundiffusion (RID)

Zur Bestimmung der Ig-Konzentrationen im Serum und in den durch Affinitätschromatographie gewonnen Eluaten wurde die einfache radiale Immundiffusion nach MANCINI et al. (22) in teilweiser Abwandlung der von GRUBER (15) beschriebenen Modifikation durchgeführt.

Die nötigen Antisera wurden in unserem Labor hergestellt. Dazu wurden Ziegen bzw. Kaninchen mit Immunglobulinisolaten immunisiert.

Anti-IgG-Gewinnung: Injektion von gereinigtem Hühner IgG. Absättigung des gewonnen Serums mit nahezu IgG-freiem Serum von dys- und agammaglobulinämischen Hühnern.

Anti-IgM-Gewinnung: Injektion von gereinigtem IgM. Absättigung des gewonnenen Serums mit IgM- und IgA-freiem Eintagsküken Serum und Serum von agammaglobulinämischen Küken.

Anti-IgA-Gewinnung: Injektion von IgA aus Hühnergallenextrakten. Absättigung mit Eintagsküken Serum und Gallenextrakten von Eintagsküken.

Die Antiseren wurden in der Immunelektrophorese und Immundiffusion auf spezifität geprüft; es verblieb eine reine Anti-H-Ketten- (Anti- α -, Anti- δ -, Anti- μ -) Aktivität.

Die Herstellung der Diffusionsplatten erfolgte auf folgende Weise:

3 %ige Agarose, in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) pH 8.0¹⁾, wurde zum Sieden gebracht, dann auf 60 °C abgekühlt. Zu der Agarlösung wurde das gleiche Volumen einer auf 55 °C erwärmten Antiserumlösung in PBS pH 7.2²⁾ zugegeben, gut gemischt und sofort zwischen zwei planparallele, durch einen Kunststoffrahmen voneinander getrennte, Glasplatten eingegossen. Die Größe der derart hergestellten Diffusionsplatten betrug in der Regel 10 x 20 cm; dadurch konnten bis zu 100 Proben auf einer Platte unter identischen Bedingungen ausgewertet werden.

Die Agarosekonzentration im Diffusionsmedium betrug 1.5 %, die Antiserumkonzentration zur IgA-Bestimmung 5.5 %, zur IgG-Bestimmung 3.3 % bzw. 4.0 % und zur IgM-Bestimmung 8.3 %. Nach Verfestigung des Agars bei Kühlschranktemperatur können tags darauf die den Serumproben entsprechenden Anzahl von Löchern ausgestanzt werden. In die Löcher werden 11 μ l einer geeigneten Probenverdünnung mittels

1) PBS pH 8.0

2.8 g NaCl
41.0 g KH_2PO_4
0.2 g NaN_3
ad 1000 ml Aqua dest.

2) PBS pH 7.2

7.2 g NaCl
1.38 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
0.43 g KH_2PO_4
ad 1000 ml Aqua dest.

einer Hamiltonpipette eingefüllt. Unter geeigneter Probenverdünnung sind solche Verdünnungsstufen von Serumproben zu verstehen, die in den von der Antiserumkonzentration bestimmten Meßbereich der RID fallen. Im Fall der Antikörpereluate war es aus diesem Grund notwendig eine Konzentrierung mit dem Faktor 3 bis teilweise 12 vorzunehmen. Sie erfolgte durch Wasserentzug mittels Dialyse gegen Polyäthylenglykoll oder mittels Unterdruckdialyse an der Wasserstrahlpumpe.

Als Standardsubstanzen dienten reine IgA-, IgG- und IgM-Lösungen, die durch Gelfiltration gewonnen wurden.

Die Proteinbestimmungen aller drei Standardlösungen erfolgte durch Extinktionsmessung bei 280 nm (s. 2.4.2.).

Auf jede Diffusionsplatte wurden mindestens 7 Verdünnungsstufen aufgetragen und für jede Platte wurde mittels linearer Regression der Standardverdünnungswerte eine Standardkurve erstellt. Die Korrelationskoeffizienten lagen zwischen 0.96 und 0.99. Die Diffusion erfolgt bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Die Diffusionszeit beträgt 48 Stunden für die IgG-, 72 Stunden für die IgA- und 96 Stunden für die IgM-Bestimmung. Nach dieser Zeit werden die Platten zusammen mit wassergetränkten Zellstofflagen gepreßt; dabei wird nicht-präzipitiertes Protein in die Zellstofflagen ausgewaschen.

Zurück bleiben Antikörper-Antiserumkomplexe, die der Antikörperkonzentration entsprechend große Ringe um die Löcher bilden. Nach Trocknung und Färbung mit Coomassie-blue, können die Platten mit Hilfe eines Mikrofilmlese-

gerätes planimetrisch ausgewertet werden. Die unteren Grenzen der Erfassbarkeit der radialen Immundiffusion liegen für IgG bei 0.3 mg/dl, für IgM bei 0.5 mg/dl und für IgA bei 0.4 mg/dl.

2.7. Agglutinationstiterbestimmung

2.7.1. 2-Merkaptoäthanol- (2-ME-) Behandlung

Die Inaktivierung der 2-ME sensitiven IgM-Antikörper (?) erfolgte durch Zusatz von 25 μ l einer 0.2 molaren 2-ME-Lösung zu dem gleichen Volumen der Serumprobe und anschließender 90 Minuten langer Inkubation bei 37 °C. Als Lösungsmittel für 2-ME diente PBS pH 7.2. Der weitere Arbeitsgang entspricht dem Vorgehen ohne 2-ME Behandlung.

2.7.2. Bestimmung der Anti-HSA-Agglutinationstiter mittels der passiven Hämagglutination

Die Kopplung von HSA an die Oberfläche von Schaferythrozyten wurde mit 0.25 %igem Glutaraldehyd, nach der von AVRAMEAS et al. (1) beschriebenen Methode, durchgeführt. Zur Inaktivierung des Komplementsystems wurden die Serumproben 30 Minuten lang auf 56 °C erwärmt.

Die Durchführung der Hämagglutination erfolgte in Mikrotiter-Platten mit V-förmigen Löchern. Von 25 μ l Serum ausgehend, wurde mit einem Takatsy-Mikrotitrator eine geometrische 1:2 Verdünnungsreihe hergestellt, als Verdün-

nungsmittel diente PBS pH 7.2. Zur Überprüfung gleicher Bedingungen wurde auf jede Platte dasselbe Anti-HSA-Kontrollserum aufgebracht. Um etwaige Spontanagglutinationen zu erkennen, wurde auf jeder Platte die erste Lochreihe lediglich mit PBS und HSA-gekoppelten Schafserythrozyten beschickt. Die Ablesung der Ergebnisse erfolgte zum ersten Mal nach 2 Stunden langer Aufbewahrung bei Raumtemperatur, zum zweiten Mal nach weiteren 18 Stunden Inkubation bei 4 °C. Die Titer werden als $\log_2$ des reziproken Wertes der letzten Verdünnungsstufe, die noch eine eindeutige Agglutination erkennen ließ, angegeben.

Zum Beispiel: $\frac{1}{8}$ Verdünnung = $\frac{1}{2^3}$ = Titer 3

2.7.3. Bestimmung der Anti-Brucellen bzw. Anti-Bordetella-Agglutinationstiter mittels der direkten Agglutination

Die Anti-Brucellen bzw. Anti-Bordetella-Agglutinationstiter wurden in Anlehnung an die von GAULTNEY et al. (14) beschriebenen Methode in Mikrotiterplatten mit V-förmigen Löchern bestimmt.

Als Antigene dienten zum einen eine 1:10 Verdünnung der Brucella-Testflüssigkeit zum anderen eine 0.15 %ige Suspension des Bordetella pertussis Impfstoffes. Als Verdünnungsmittel wurde PBS pH 7.2 verwendet. Zur besseren Ablesbarkeit der Agglutinationsergebnisse wurde Methylenblau zugesetzt.

Zur Inaktivierung des Komplementsystems wurden die Serum-

proben 30 Minuten auf 56 °C erwärmt. Wie bei der HSA-Agglutination, wurden auch hier Anti-Brucellen- bzw. Anti-Bordetella-Kontrollseren auf jeder Platte mitgeführt. Nach 24 Stunden langer Inkubation bei 37 °C und anschließender Aufbewahrung bei 4 °C für 2 Stunden erfolgte die Ablesung der Mikrotiterplatten wie es bei der Hämagglutination unter Punkt 2.7.2. beschrieben wurde.

2.8. Versuchsablauf

Vor Beginn der Immunisierung, wie auch nach der letzten Blutentnahme, wurde das Immunglobulinmuster der Einzeltiere durch Immunelektrophorese kontrolliert. In der Gruppe der dysgammaglobulinämischen Tiere wurde nur die permanente Form im Versuch belassen; die transitorische Form wurde eliminiert. Es wurde eine Einteilung der Versuchstiere nach folgenden Gesichtspunkten getroffen: Jedes der drei Antigene wurde an Kontroll- und dysgammaglobulinämische Tiere verabreicht, wobei eine weitere Unterteilung, ohne und mit zusätzlicher FCA-Applikation, getroffen wurde.

Daraus ergibt sich folgendes Einteilungsschema:

Antigen	B.pertussis		B.abortus		HSA	
Tiertyp	KO	DYS	KO	DYS	KO	DYS
Gruppe ohne FCA	1	3	5	9 10	11 12	17 18
Gruppe mit FCA	2	4	6 7 8		13 14	19 20 15 16 21

Einige Seren konnten aus der Arbeit WANKE (35) übernommen werden. Da dort u.a. der Einfluß verschiedener Applikationsarten und einer Zweitimmunisierung auf den Immunglobulinserumspiegel untersucht wurden, kamen insgesamt drei verschiedene Applikationsformen, i.v., i.m. und i.p., zum Einsatz. Die Gruppe 17 wies eine Boosterinjektion mit HSA, 28 Tage nach der Erstimmunisierung, auf.

Die Blutentnahmen erfolgten durch Punktion der Flügelvene in wöchentlichem Abstand. Die Serumgewinnung erfolgte - nach 45-minütiger Inkubation bei 37 °C und 18-stündiger Lagerung bei 4 °C - durch Abpipettieren des über dem Blutkuchen stehenden Serums. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Seren bei -20 °C tiefgefroren.

Um mit den Antikörperquantitäten in den Nachweisbarkeitsbereich der radialen Immundiffusion (s. 2.6.) zu gelangen wurden innerhalb der Versuchstiergruppen Sammelproben gebildet. Dabei wurden zweckmäßigerweise frühe Blutentnahmen (7-21 Tage nach Immunisierung) und späte Blutentnahmen (28-49 Tage nach Immunisierung) zu je einer Sammelprobe zusammengefaßt. Bei einigen mit HSA immunisierten, dysgammaglobulinämischen Gruppen wurden auch noch Sammelproben aus sehr späten Blutentnahmen (49-56 Tage nach Immunisierung) gebildet.

Das Schema eines Versuchablaufs und der Behandlung einer Sammelprobe wird am Beispiel der Gruppe 3a auf Seite 18 gegeben.

Behandlung einer Serumprobe am Beispiel der Gruppe 3a

1. Gewinnung der Sammelprobe 3a

Blutentnahme	1	2	3	
Tage n. Imm.	7	10	14	
Tier Nr. 1576	1000	1000	1000	Einzel- mengen in μ l
1581	1000	1000	1000	
1582	1000	1000	1000	
1583	1000	1000	1000	
1584	1000	1000	1000	
15000				Gesamt- menge in μ l

Die Sammelprobe 3a umfaßt Blutentnahmen von mit *Bordetella pertussis* i.m. immunisierten dysg. Hühnern.

2. Bestimmung des Antikörpertiters durch Agglutination

	Probe
	3a Titer vor ME-Behandlung
	3a Titer nach ME-Behandlung
	Kontrollserum (s. 2.7.3.)

erste Lochreihe: nur PBS + *Bordetella pertussis*-Antigen

3. Proteinbestimmung

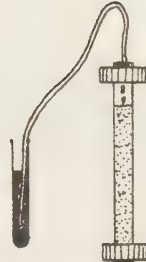
- Gesamtproteingehalt des Serums (s. 2.4.1.) 4714 mg/dl
- Antikörperproteingehalt der Eluate nach der Affinitätschromatographie (s. 2.4.2.) 4.4 mg/dl

4. Affinitätschromatographie

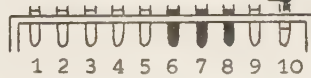
a. Dialyse gegen Startpuffer



b. Säulenlauf



Eluatfraktionen



c. Extinktionsmessung zur Ermittlung der antikörperhaltigen Eluatfraktionen (s. 2.4.2.). Anschließendes Zusammenfassen zu einer Eluatprobe.

5. Konzentrierung des Eluats

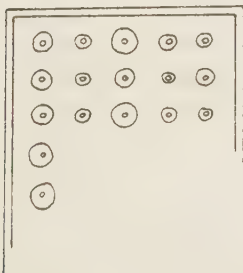


Wasserentzug



mit der Wasserstrahlpumpe oder durch Polyäthylenglykoll

6. Einfache, radiale Immundiffusion



IgA	200	mg/dl
A-AK	1.1	mg/dl
IgG	10	mg/dl
G-AK	0.8	mg/dl
IgM	900	mg/dl
M-AK	1.2	mg/dl

Leerseite aus drucktechnischen Gründen

3. Ergebnisse

3.1. Immunglobulin- und Antikörperserumspiegel nach Immunisierung mit Bordetella pertussis, Brucella abortus und Humanserumalbumin mit und ohne zusätzliche FCA-Gabe

In den folgenden Abbildungen und Tabellen werden die Immunglobulin- und Antikörperspiegel aus Serumsammelproben unterschiedlich immunisierter Kontrollhühner und dysgammaglobulinämischer Hühner dargestellt. Zur Verdeutlichung der Gewinnung einer Sammelprobe kann das Schema eines Versuchsablaufes auf Seite 18 herangezogen werden. Da der Zeitraum der Blutentnahmen nicht bei allen Sammelproben identisch ist, wird er jeweils in den einzelnen Tabellen in der Spalte BE (= Blutentnahmen) aufgeführt.

In den Tabellen sind außerdem ersichtlich:

- der Immunisierungsmodus (Antigen, $\pm$ FCA)
- die Anzahl der Versuchstiere, aus deren Einzelserumproben die Sammelproben zusammengefaßt wurden
- die Gesamtprotein- und Antikörperproteingehalte der Sammelproben in mg/dl (Methoden siehe 2.4.1. und 2.4.2.)
- die Agglutinationstiter ohne (-) bzw. mit (+) Merkaptotäthanolbehandlung (ME-Behandlung)
- die Ergebnisse der radialen Immundiffusion (RID) bei den drei Immunglobulinklassen A, G und M

Die weißen Säulen  entsprechen den Immunglobulinprotein-, die schwarzen Säulen  den Antikörperproteinkonzentrationen in mg/dl

Ig-Protein
in mg/dl

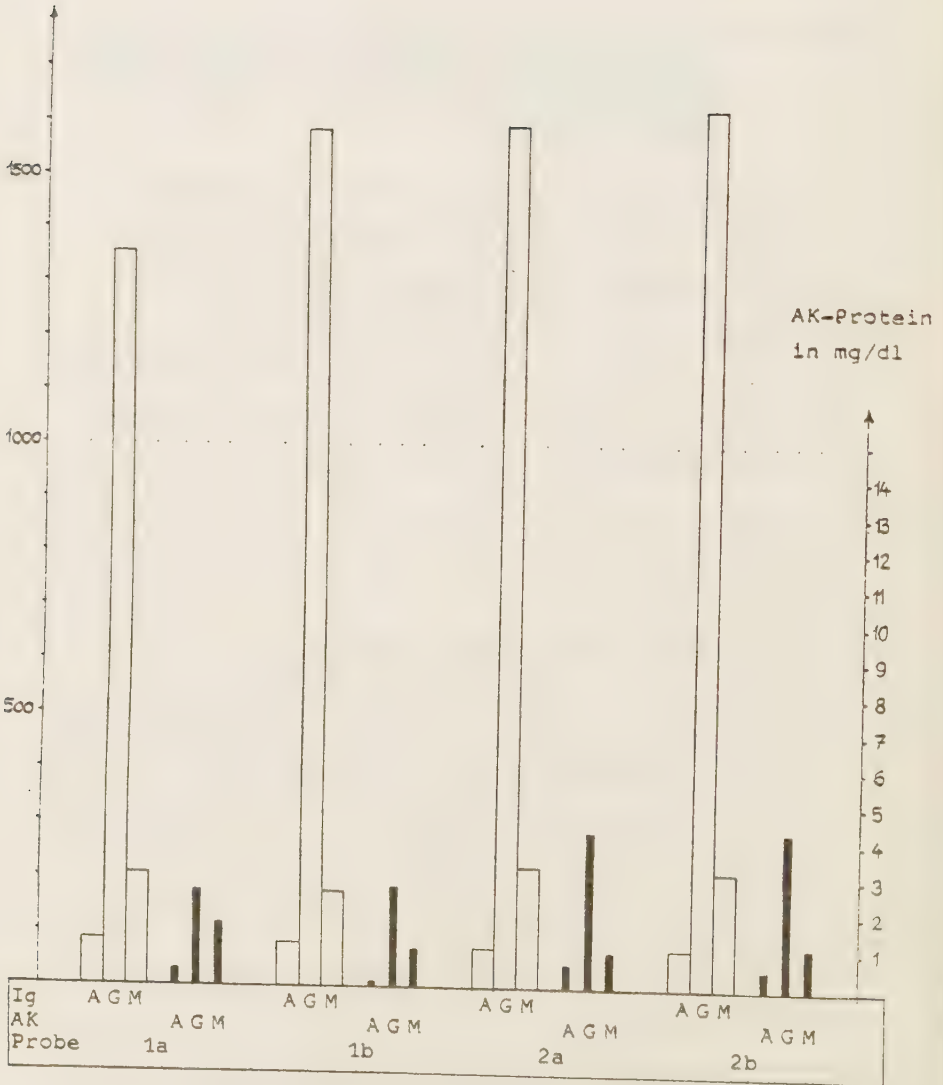


Abb.1 Immunglobulin- und Antikörperspiegel von Kontrollhühnern, die mit B.pertussis (1a u. 1b) bzw. mit B.pertussis + FCA (2a u. 2b) i.m. immunisiert wurden

Tabelle 1 zur Abbildung 1

In der Spalte BE ist der Zeitraum der Blutentnahmen nach Immunisierung in Tagen aufgeführt. In der Spalte Tiertyp steht das Symbol KO für Kontrollhühner. Die Angaben bei Gesamtprotein, Antikörperprotein und radialer Immundiffusion (RID) verstehen sich als Konzentrationsangaben in mg/dl.

Gruppen Nr. Tiertyp	1a KO	1b KO	2a KO	2b KO
Immunisierungsmodus	B.per-tussis	B.per-tussis	B.per-tussis + FCA	B.per-tussis + FCA
Tierzahl	6	6	6	6
BE	10-21	28-42	10-21	28-42

Gesamtprotein	4571	4143	4857	5214
AK-Protein	6.1	7.1	8.8	4.7
Aggl.-titer -/+ ME-Bhdlg.	5/3	8/7	7/4	9/8
RID				
IgA	90.0	83.0	79.0	79.0
A-AK	0.6	---	0.7	0.4
IgG	1378.0	1611.0	1611.0	1647.0
G-AK	2.6	2.6	4.3	4.3
IgM	207.0	178.0	227.0	222.0
M-AK	1.8	1.1	1.0	1.1

Ig-Protein
in mg/dl

AK-Protein
in mg/dl

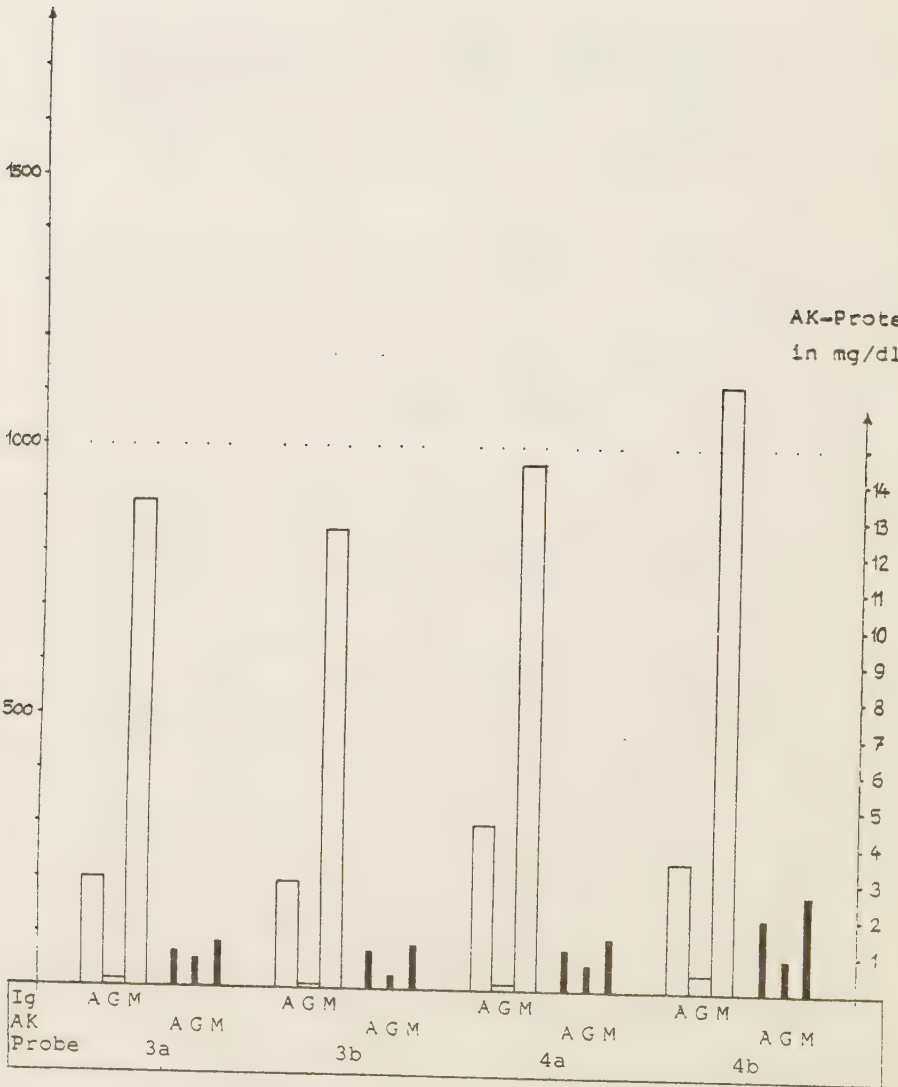


Abb.2 Immunglobulin- und Antikörperspiegel von dysg. Hühnern, die mit B.pertussis (3a u. 3b) bzw. mit B. pertussis + FCA (4a u. 4b) i.m. immunisiert wurden

Tabelle 2 zur Abbildung 2

In der Spalte BE ist der Zeitraum der Blutentnahmen nach Immunisierung in Tagen aufgeführt. In der Spalte Tiertyp steht das Symbol DYS für dysgammaglobulinämische Hühner. Die Angaben bei Gesamtprotein, Antikörperprotein und radialer Immundiffusion (RID) verstehen sich als Konzentrationsangaben in mg/dl.

Gruppen Nr. Tiertyp	3a DYS	3b DYS	4a DYS	4b DYS
Immunisierungsmodus	B.per-tussis	B.per-tussis	B.per-tussis + FCA	B.per-tussis + FCA
Tierzahl	5	5	5	5
BE	10-21	28-42	10-21	28-42

Gesamtprotein	4714	4786	4143	4571
AK-Protein	4.4	4.1	6.7	7.2
Aggl.-titer -/+ ME-Bhdlg	8/2	7/2	7/2	9/2
RID				
IgA	200.0	196.0	305.0	246.0
A-AK	1.1	1.0	1.3	2.1
IgG	10.0	6.1	15.8	39.4
G-AK	0.8	0.4	0.6	0.9
IgM	900.0	852.0	972.0	1134.0
M-AK	1.2	1.4	1.5	2.7

Ig-Protein
in mg/dl

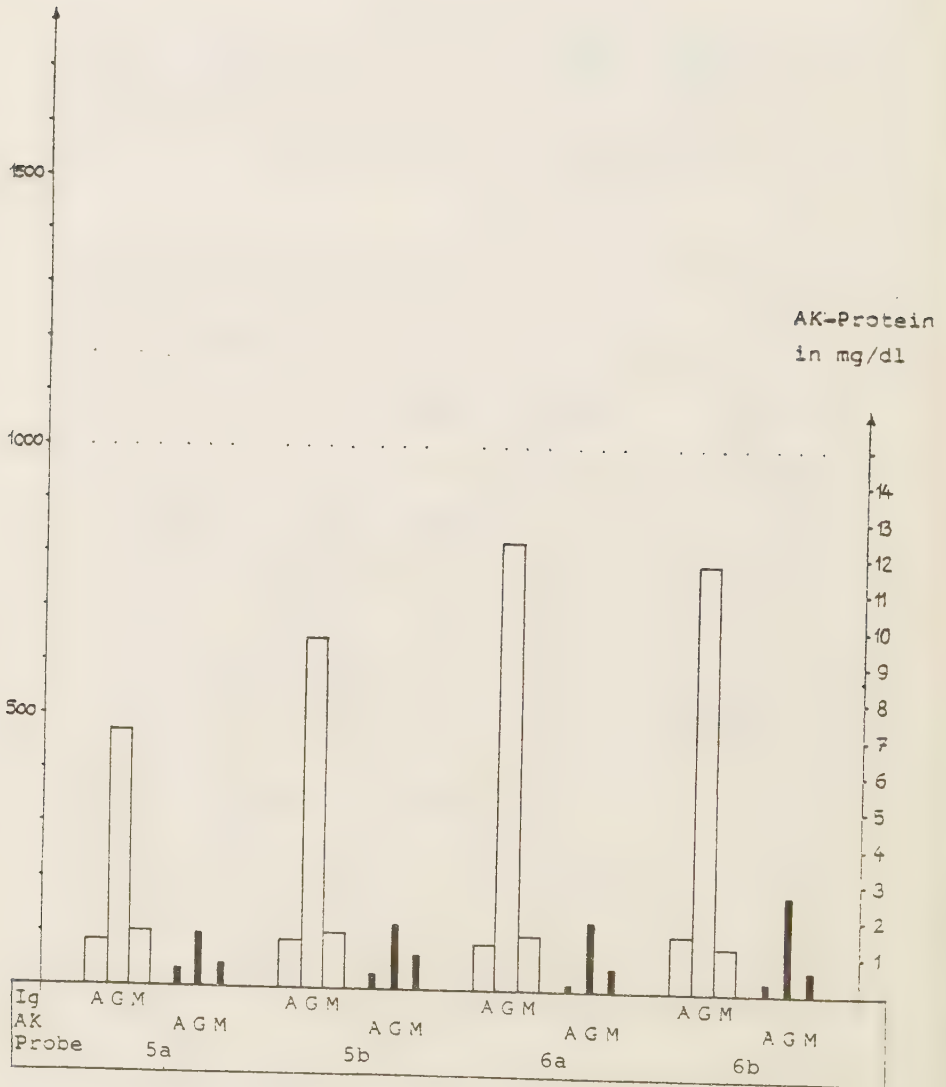


Abb.3 Immunglobulin-□ und Antikörperspiegel ■ von Kontrollhühnern, die mit B.abortus (5a u. 5b) bzw. B. abortus + FCA (6a u. 6b) i.p. immunisiert wurden

Tabelle'3 zur Abbildung 3

In der Spalte BE ist der Zeitraum der Blutentnahmen nach Immunisierung in Tagen aufgeführt. In der Spalte Tiertyp steht das Symbol KO für Kontrollhühner. Die Angaben bei Gesamtprotein, Antikörperprotein und radialer Immundiffusion (RID) verstehen sich als Konzentrationsangaben in mg/dl.

Gruppen Nr. Tiertyp	5a KO	5b KO	6a KO	6b KO
Immunisierungsmodus	B.ab- ortus	B.ab- ortus	B.ab- ortus + FCA	B.ab- ortus + FCA
Tierzahl	8	6	6	6
BE	9-14	35-42	9-21	49

Gesamtprotein	4500	4641	4935	4500
AK-Protein	4.2	5.2	3.4	8.4
Aggl.-titer -/+ ME-Bhdlg.	6/3	6/3	6/2	5/3
RID				
IgA	67.0	82.0	78.0	98.0
A-AK	0.4	0.3	0.1	0.3
IgG	469.0	688.0	835.0	792.0
G-AK	1.4	1.6	1.8	2.8
IgM	97.1	97.1	103.0	86.0
M-AK	0.7	1.0	0.5	0.6

Ig-Protein
in mg/dl

AK-Protein
in mg/dl

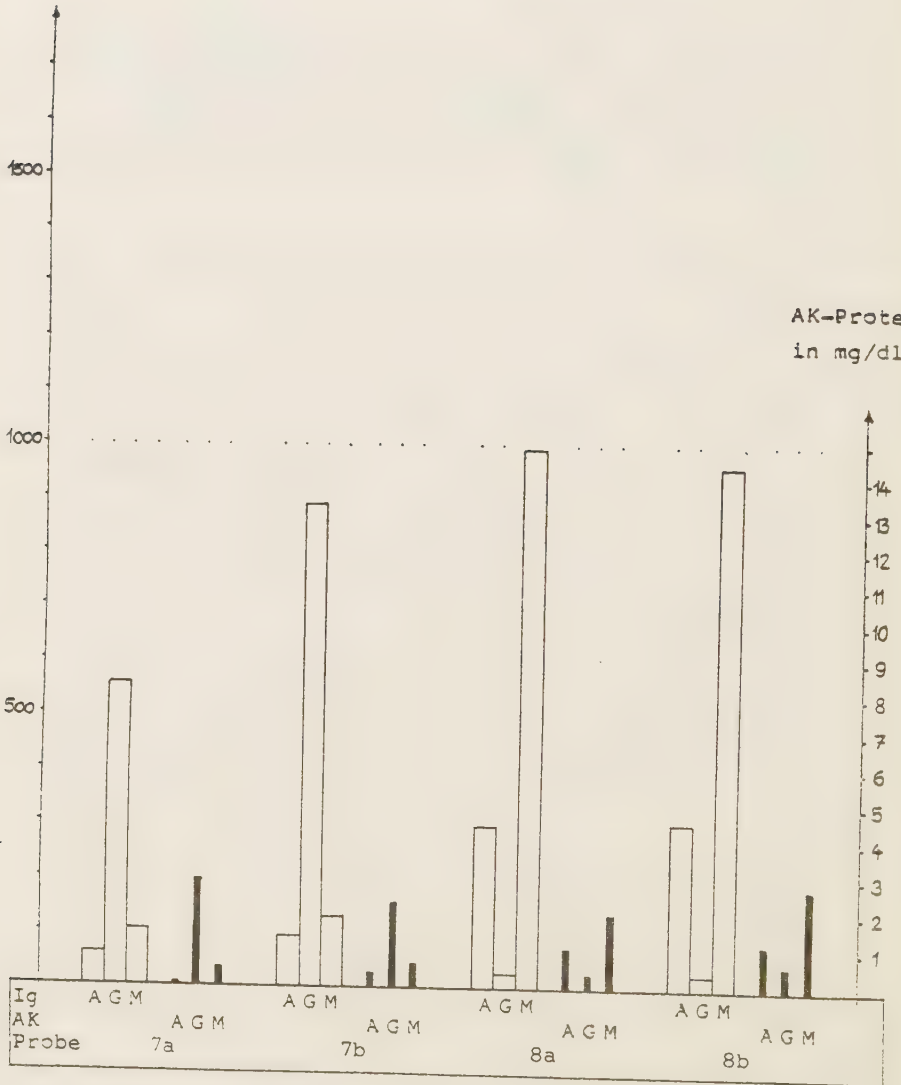


Abb.4 Immunglobulin-□ und Antikörperspiegel ■ von Kontrollhühnern (7a u. 7b) bzw. dysg. Hühnern (8a u. 8b), die mit B.abortus + FCA i.p. immunisiert wurden

Tabelle 4 zur Abbildung 4

In der Spalte BE ist der Zeitraum der Blutentnahmen nach Immunisierung in Tagen aufgeführt. In der Spalte Tiertyp stehen die Symbole KO für Kontrollhühner und DYS für dysgammaglobulinämische Hühner. Die Angaben bei Gesamtprotein, Antikörperprotein und radialer Immundiffusion (RID) verstehen sich als Konzentrationsangaben in mg/dl.

Gruppen Nr. Tiertyp	7a KO	7b KO	8a DYS	8b DYS
Immunisierungsmodus	B.ab- ortus + FCA	B.ab- ortus + FCA	B.ab- ortus + FCA	B.ab- ortus + FCA
Tierzahl	6	6	7	7
BE	9-21	28-42	9-21	35-42

Gesamtprotein	4641	4358	3794	4500
AK-Protein	6.2	2.3	4.3	3.8
Aggl.-titer -/+ ME-Bhdlg.	6/3	7/3	10/2	10/2
RID				
IgA	64.0	86.0	290.0	310.0
A-AK	---	0.3	1.0	1.2
IgG	549.0	890.0	24.2	21.4
G-AK	2.8	2.2	0.3	0.5
IgM	103.0	122.0	994.0	932.0
M-AK	0.4	0.6	2.1	2.7

Ig-Protein
in mg/dl

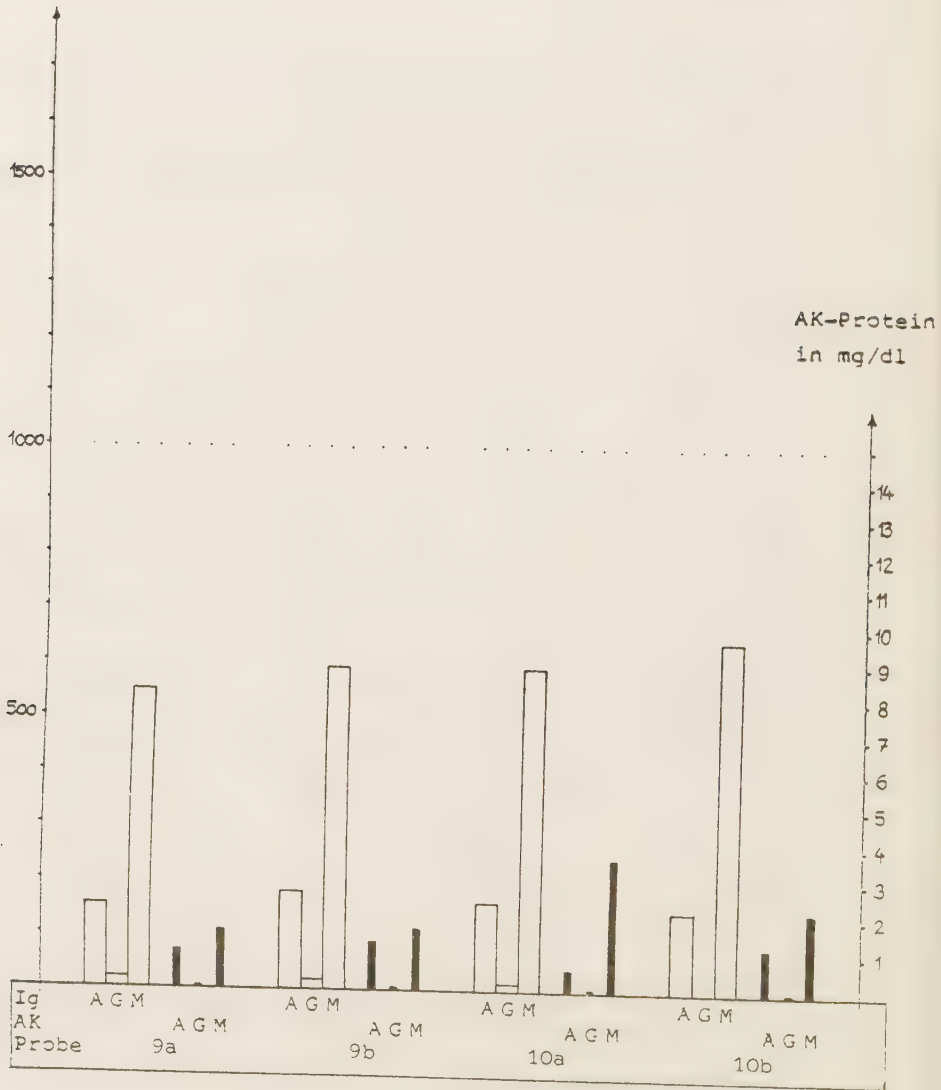


Abb.5 Immunglobulin- und Antikörperspiegel von dysg. Hühnern, die mit *Brucella abortus* i.p. (9a u. 9b) bzw. i.m. (10a u. 10b) immunisiert wurden

Tabelle 5 zur Abbildung 5

In der Spalte BE ist der Zeitraum der Blutentnahmen nach Immunisierung in Tagen aufgeführt. In der Spalte Tiertyp steht das Symbol DYS für dysgammaglobulinämische Hühner. Die Angaben bei Gesamtprotein, Antikörperprotein und radialer Immundiffusion (RID) verstehen sich als Konzentrationsangaben in mg/dl.

Gruppen Nr. Tiertyp	9a DYS	9b DYS	10a DYS	10b DYS
Immunisierungsmodus	B.ab- ortus	B.ab- ortus	B.ab- ortus	B.ab- ortus
Tierzahl	6	6	4	4
BE	7-21	35-49	9-21	28-35

Gesamtprotein	3935	4218	4358	4076
AK-Protein	5.9	---	6.7	5.9
Aggl.-titer -/+ ME-Bhdlg.	6/2	8/2	10/2	10/1
RID				
IgA	164.0	187.0	164.0	151.0
A-AK	1.1	1.4	0.7	1.4
IgG	21.4	24.2	14.9	---
G-AK	---	---	---	---
IgM	547.0	597.0	597.0	649.0
M-AK	1.6	1.7	3.7	2.2

Ig-Protein
in mg/dl

AK-Protein
in mg/dl

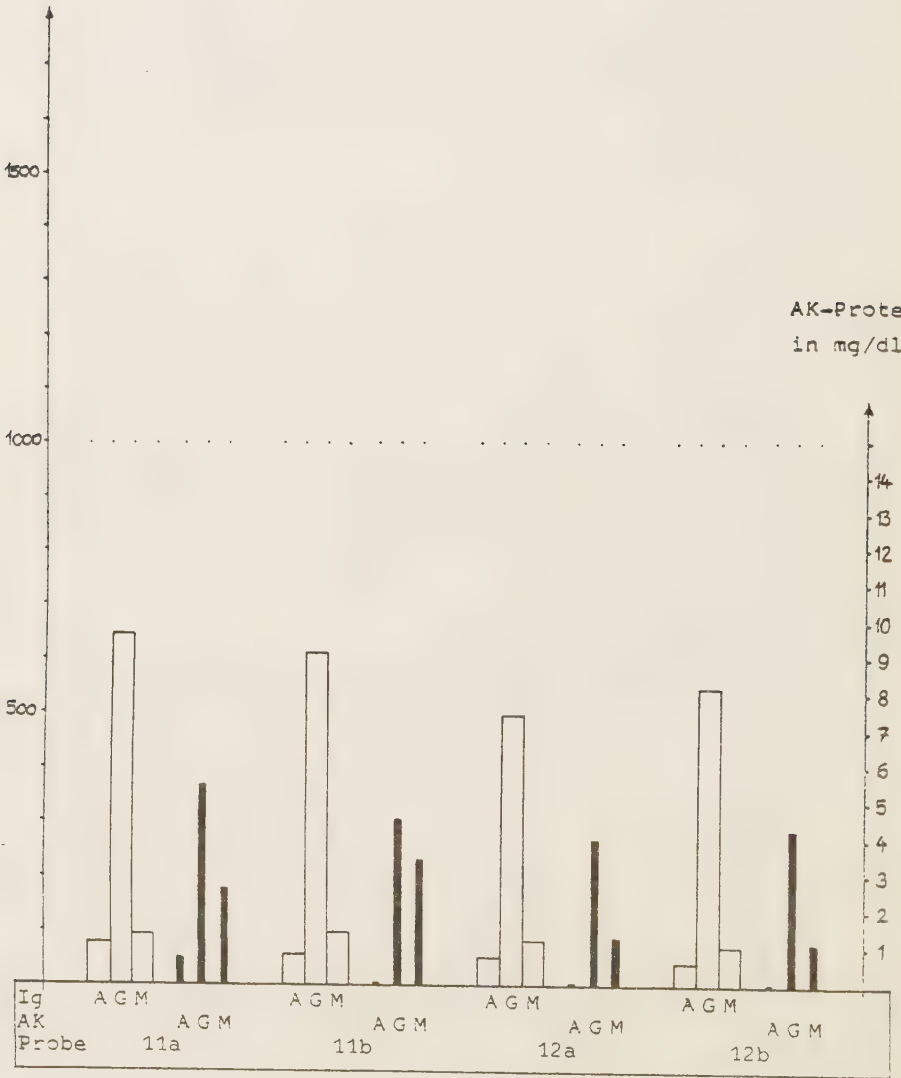


Abb.6 Immunglobulin-  und Antikörperspiegel  von Kontrollhühnern, die mit HSA i.v. (11a u. 11b) bzw. i.p. (12a u. 12b) immunisiert wurden

Tabelle 6 zur Abbildung 6

In der Spalte BE ist der Zeitraum der Blutentnahmen nach Immunisierung in Tagen aufgeführt. In der Spalte Tiertyp steht das Symbol KO für Kontrollhühner. Die Angaben bei Gesamtprotein, Antikörperprotein und radialer Immundiffusion (RID) verstehen sich als Konzentrationsangaben in mg/dl.

Gruppen Nr. Tiertyp	11a KO	11b KO	12a KO	12b KO
Immunisierungsmodus	HSA	HSA	HSA	HSA
Tierzahl	6	6	5	5
BE	9-14	35-42	9-14	28

Gesamtprotein	4571	4571	4286	4571
AK-Protein	14.7	13.3	6.5	5.8
Aggl.-titer -/+ ME-Bhdlg.	5/1	5/2	5/2	5/3
RID				
IgA	71.0	54.0	54.0	41.0
A-AK	0.7	---	---	---
IgG	634.0	611.0	490.0	561.0
G-AK	5.5	4.5	4.1	4.3
IgM	89.4	89.4	86.0	75.0
M-AK	2.6	3.5	1.4	1.0

Ig-Protein
in mg/dl

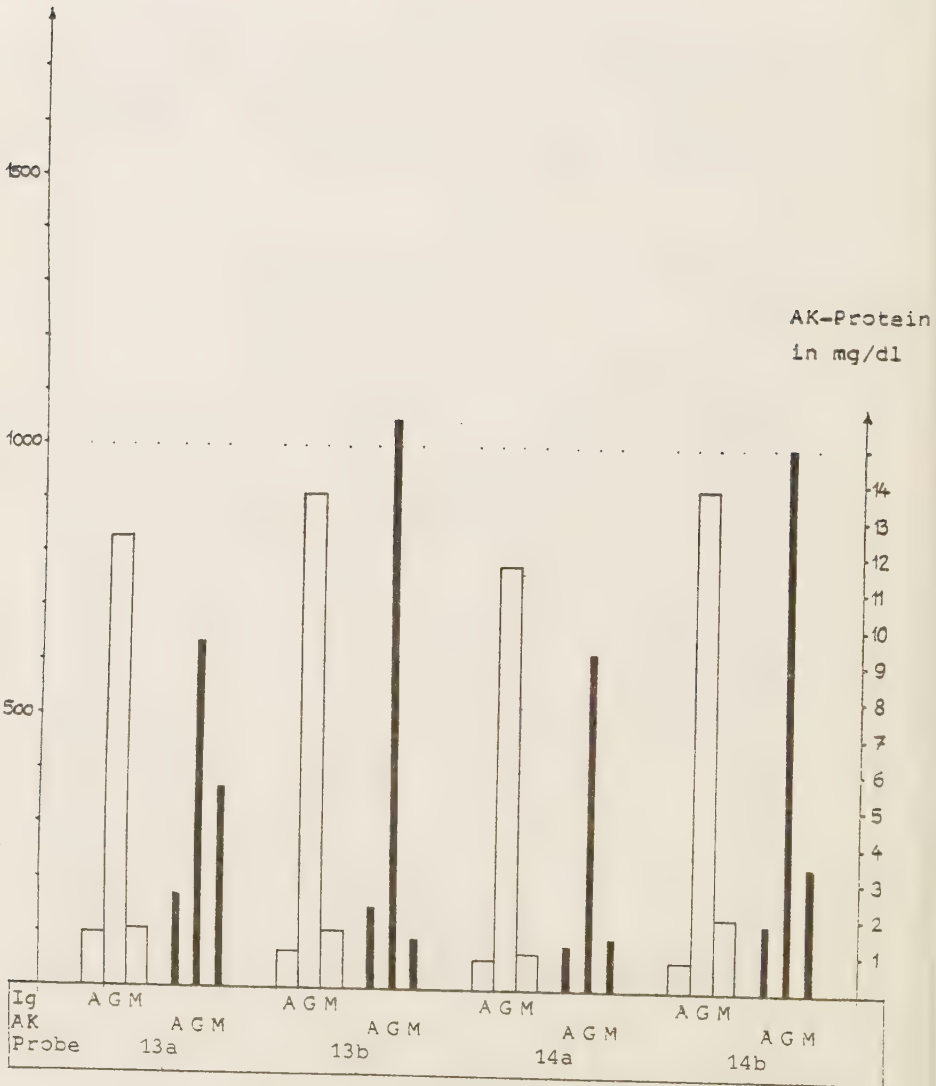


Abb.7 Immunglobulin- und Antikörperspiegel von Kontrollhühnern, die mit HSA + FCA i.m. immunisiert wurden (13a, 13b, 14a u. 14b)

Tabelle 7 zur Abbildung 7

In der Spalte BE ist der Zeitraum der Blutentnahmen nach Immunisierung in Tagen aufgeführt. In der Spalte Tiertyp steht das Symbol KO für Kontrollhühner. Die Angaben bei Gesamtprotein, Antikörperprotein und radialer Immundiffusion (RID) verstehen sich als Konzentrationsangaben in mg/dl.

Gruppen Nr. Tiertyp	13a KO	13b KO	14a KO	14b KO
Immunisierungsmodus	HSA + FCA	HSA + FCA	HSA + FCA	HSA + FCA
Tierzahl	6	6	5	5
BE	9-21	42-49	7-21	35-49

Gesamtprotein	5000	4429	4857	4571
AK-Protein	11.1	17.2	12.9	11.0
Aggl.-titer -/+ ME-Bhdlg.	6/4	8/6	6/5	8/3
RID				
IgA	96.0	65.0	54.0	61.0
A-AK	2.8	2.3	1.2	1.8
IgG	832.0	920.0	780.0	996.0
G-AK	9.7	15.8	9.5	15.1
IgM	105.0	111.0	61.0	140.0
M-AK	5.7	1.1	1.3	3.5

Ig-Protein
in mg/dl

AK-Protein
in mg/dl

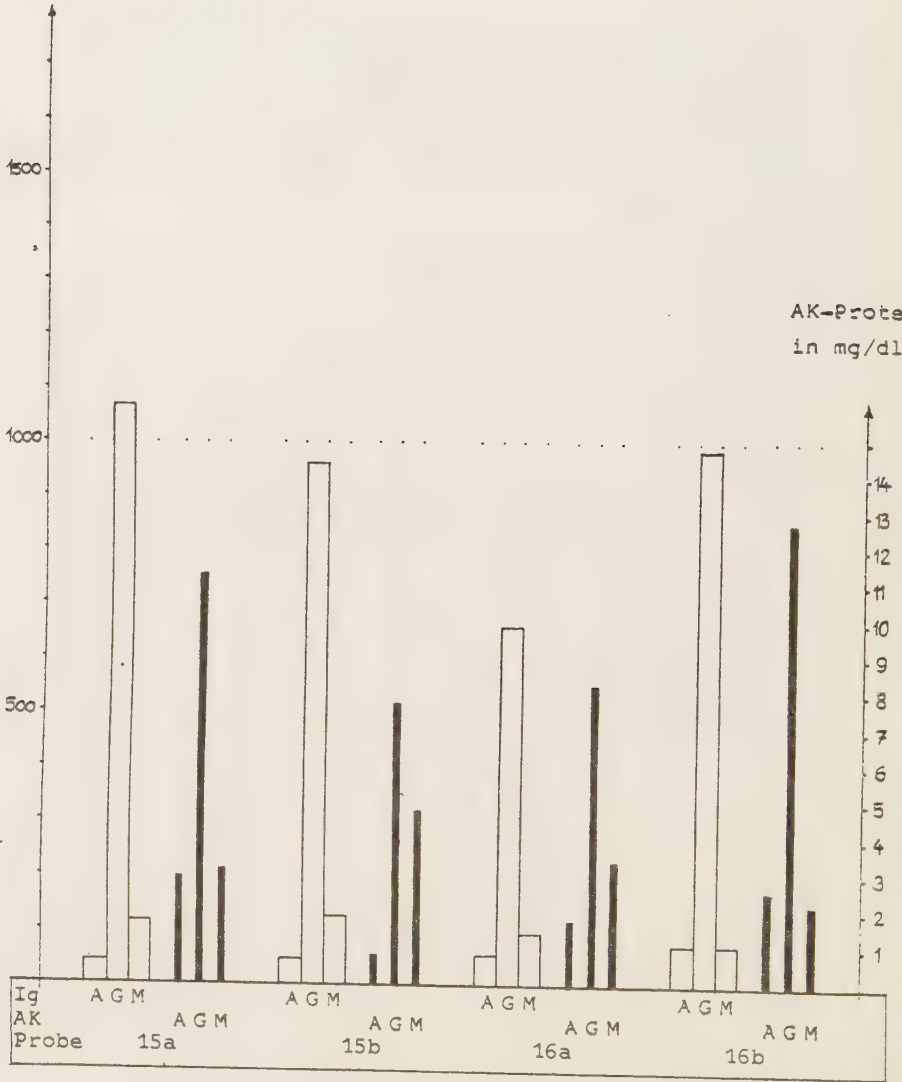


Abb.8 Immunglobulin- und Antikörperspiegel von Kontrollhühnern, die mit HSA i.p. + FCA immunisiert wurden (15a, 15b, 16a u. 16b)

Tabelle 8 zur Abbildung 8

In der Spalte BE ist der Zeitraum der Blutentnahmen nach Immunisierung in Tagen aufgeführt. In der Spalte Tiertyp steht das Symbol KO für Kontrollhühner. Die Angaben bei Gesamtprotein, Antikörperprotein und radialer Immundiffusion (RID) verstehen sich als Konzentrationsangaben in mg/dl.

Gruppen Nr. Tiertyp	15a KO	15b KO	16a KO	16b KO
Immunisierungsmodus	HSA + FCA	HSA + FCA	HSA + FCA	HSA + FCA
Tierzahl	6	6	5	5
BE	9-21	28-42	7-21	35-49

Gesamtprotein	4571	4571	4714	4857
AK-Protein	20.0	17.7	12.9	15.9
Aggl.-titer -/+ ME-Bhdlg.	5/3	5/2	5/4	6/6
RID				
IgA	37.0	41.0	54.0	80.0
A-AK	2.9	0.8	1.8	2.7
IgG	1072.0	952.0	653.0	982.0
G-AK	11.4	7.9	8.3	12.9
IgM	111.0	121.0	99.0	74.0
M-AK	3.1	4.9	3.3	2.2

Ig-Protein
in mg/dl

AK-Protein
in mg/dl

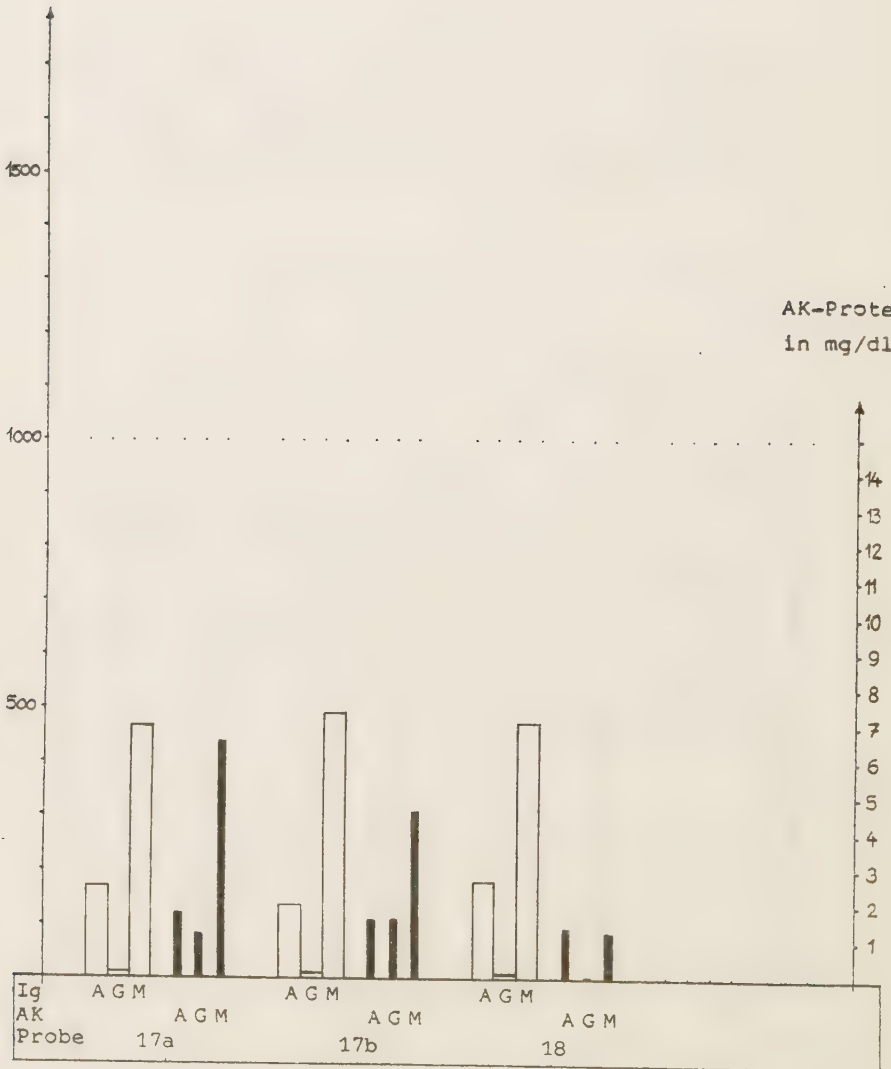


Abb.9 Immunglobulin-  und Antikörperspiegel  von dysq. Hühnern, die mit HSA i.v. immunisiert wurden (17a, 17b und 18)

Tabelle 9 zur Abbildung 9

In der Spalte BE ist der Zeitraum der Blutentnahmen nach Immunisierung in Tagen aufgeführt. In der Spalte Tiertyp steht das Symbol DYS für dysgammaglobulinämische Hühner. Die Angaben bei Gesamtprotein, Antikörperprotein und radialer Immundiffusion (RID) verstehen sich als Konzentrationsangaben in mg/dl.

Gruppen Nr.	17a	17b	18
Tiertyp	DYS	DYS	DYS
Immunisierungsmodus	HSA	HSA	HSA
Tierzahl	5	5	1
BE	7-21	35-49	14

Gesamtprotein	4143	4429	4143
AK-Protein	23.2	24.6	3.8
Aggl.-titer -/+ ME-Bhdlg.	5/0	5/0	4/0
RID			
IgA	168.0	135.0	184.0
A-AK	1.9	1.6	1.2
IgG	11.0	11.0	5.2
G-AK	1.2	1.6	---
IgM	469.0	495.0	470.0
M-AK	6.8	4.6	1.1

Ig-Protein
in mg/dl

AK-Protein
in mg/dl

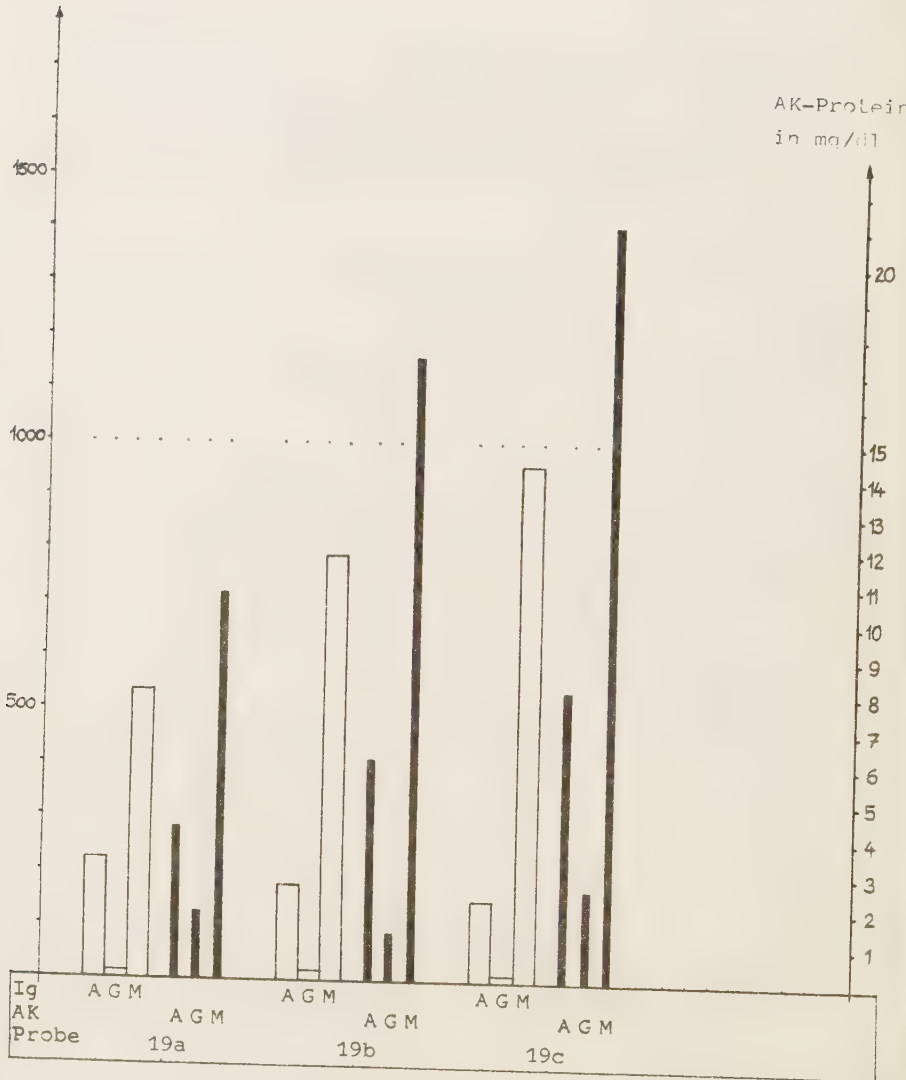


Abb.10 Immunglobulin- und Antikörperspiegel von dysc. Hühnern, die mit HSA + FCA i.m. immunisiert wurden (19a, 19b u. 19c)

Tabelle 10 zur Abbildung 10

In der Spalte BE ist der Zeitraum der Blutentnahmen nach Immunisierung in Tagen aufgeführt. In der Spalte Tiertyp steht das Symbol DYS für dysgammaglobulinämische Hühner. Die Angaben bei Gesamtprotein, Antikörperprotein und radialer Immundiffusion (RID) verstehen sich als Konzentrationsangaben in mg/dl.

Gruppen Nr. Tiertyp	19a DYS	19b DYS	19c DYS
Immunisierungsmodus	HSA + FCA	HSA + FCA	HSA + FCA
Tierzahl	6	6	6
BE	14-21	35-42	56
Gesamtprotein	4357	4429	4286
AK-Protein	28.0	30.1	37.5
Aggl.-titer -/+ ME-Bhdlg.	8/0	9/1	9/0
RID			
IgA	225.0	178.0	150.0
A-AK	4.2	6.1	8.1
IgG	19.1	14.0	13.8
G-AK	1.9	1.3	2.5
IgM	538.0	789.0	96.1
M-AK	10.8	17.6	21.2

Ig-Protein
in mg/dl

AK-Protein
in mg/dl

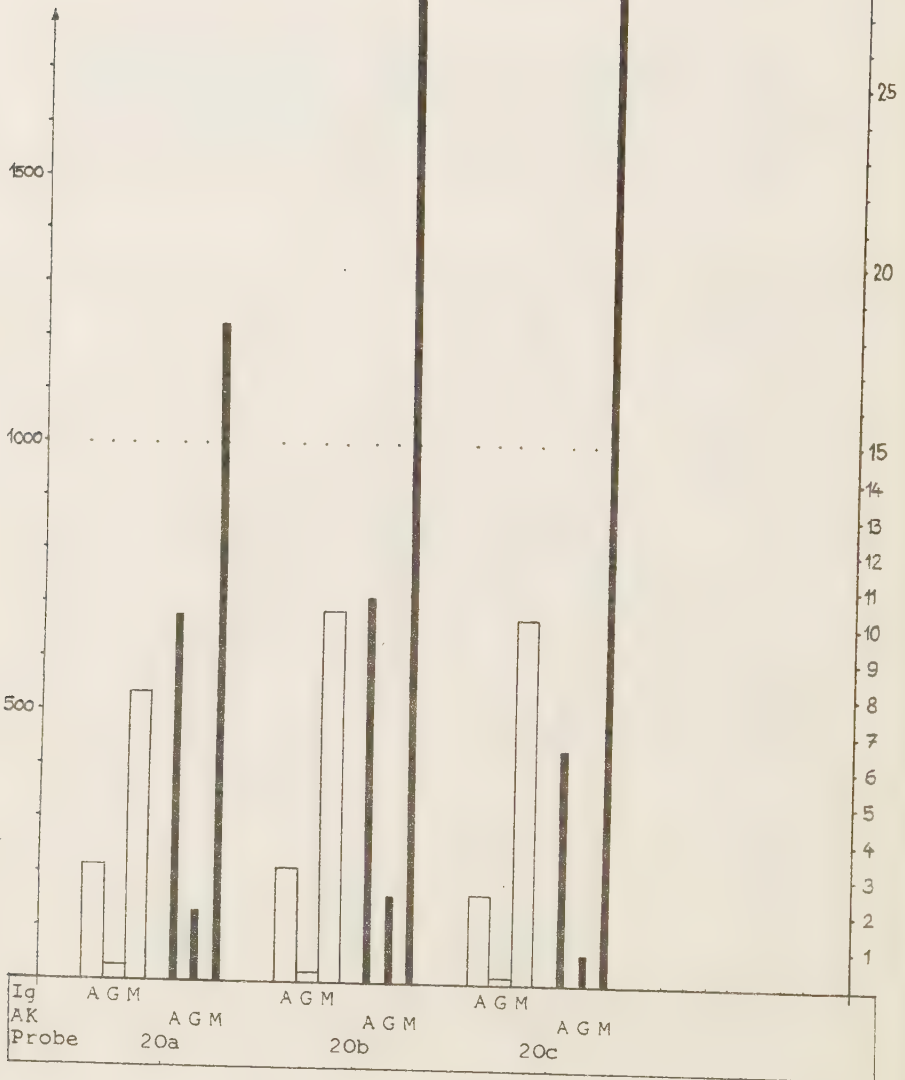


Abb.11 Immunglobulin- und Antikörperspiegel von dysg. Hühnern, die mit HSA + FCA i.m. immunisiert wurden (20a, 20b und 20c)

Tabelle 11 zur Abbildung 11

In der Spalte BE ist der Zeitraum der Blutentnahmen nach Immunisierung in Tagen aufgeführt. In der Spalte Tiertyp steht das Symbol DYS für dysgammaglobulinämische Hühner. Die Angaben bei Gesamtprotein, Antikörperprotein und radialer Immundiffusion (RID) verstehen sich als Konzentrationsangaben in mg/dl.

Gruppen Nr. Tiertyp	20a DYS	20b DYS	20c DYS
Immunisierungsmodus	HSA + FCA	HSA + FCA	HSA + FCA
Tierzahl	6	6	6
BE	21	35-42	49

Gesamtprotein	4214	4429	4286
AK-Protein	33.5	38.8	30.8
Aggl.-titer -/+ ME-Bhdlg.	10/1	10/2	9/0
RID			
IgA	214.0	210.0	175.0
A-AK	10.3	10.7	6.5
IgG	31.5	16.5	15.1
G-AK	2.0	2.4	1.0
IgM	527.0	689.0	678.0
M-AK	18.6	28.1	31.5

Ig-Protein
in mg/dl

AK-Protein
in mg/dl

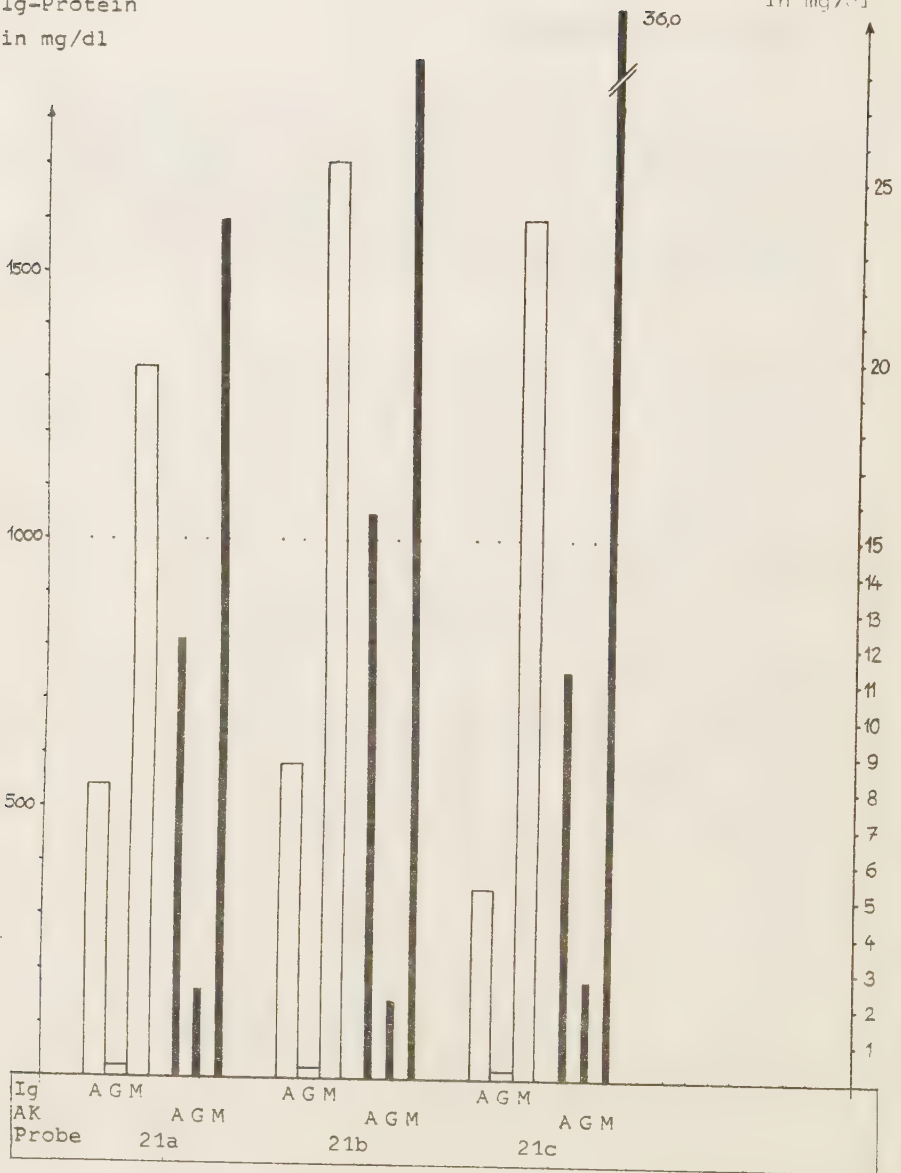


Abb.12 Immunglobulin- und Antikörperspiegel von dysg. Hühnern, die mit HSA + FCA i.p. immunisiert wurden (21a, 21b u. 21c)

Tabelle 12 zur Abbildung 12

In der Spalte BE ist der Zeitraum der Blutentnahmen nach Immunisierung in Tagen aufgeführt. In der Spalte Tiertyp steht das Symbol DYS für dysgammaglobulinämische Hühner. Die Angaben bei Gesamtprotein, Antikörperprotein und radialer Immundiffusion (RID) verstehen sich als Konzentrationsangaben in mg/dl.

Gruppen Nr. Tiertyp	21a DYS	21b DYS	21c DYS
Immunisierungsmodus	HSA + FCA	HSA + FCA	HSA + FCA
Tierzahl	6	6	6
BE	14-21	42	49

Gesamtprotein	4571	4357	4429
AK-Protein	38.7	54.8	60.5
Aggl.-titer -/+ ME-Bhdlg.	8/2	10/2	8/0
RID			
IgA	542.4	585.3	350.0
A-AK	12.3	15.8	11.4
IgG	19.1	19.1	11.9
G-AK	2.4	2.1	2.6
IgM	1321.0	1732.0	1584.0
M-AK	24.0	28.8	36.0

Die Abbildungen und Tabellen 1-12 zeigen die Ig- und AK-Spiegel von Kontroll- und dysg. Hühnern nach Immunisierung mit verschiedenen Antigenen, jeweils mit und ohne zusätzlicher Adjuvansgabe. Die darin enthaltenen Werte dienen als Grundlage für die unter Punkt 3.2. beschriebene Untersuchung zum FCA-Effekt und die unter Punkt 3.3. beschriebene Untersuchung der Immunogenität dieser Antigene.

In den Tabellen werden die Antikörperanteile am Immunglobulinprotein nicht gesondert aufgeführt. Zusammenfassend kommt man zu folgenden Aussagen:

- Der prozentuale AK-Proteinanteil am Ig-Protein bewegt sich nach Immunisierung mit B.pertussis bzw. B.abortus in dem engen Rahmen von 0.2-0.4 %, gültig für Kontroll- und dysg. Hühner ± Adjuvansgabe.
- Bei der Betrachtung des AK-Proteinanteils am Ig-Protein nach Immunisierung mit HSA muß zwischen Kontroll- und dysg. Hühnern, jeweils mit und ohne FCA-Gabe, unterschieden werden. Bei Kontrollhühnern, die mit HSA allein immunisiert wurden, bewegt sich der Anteil zwischen 0.8-1.1 %, bei dysg. Hühnern zwischen 1.2-1.5 %. Zusätzliche FCA-Gabe hebt den AK-Proteinanteil bei Kontrollhühnern auf 1.2-1.8 %, bei dysg. Hühnern auf 2.2-3.3 % (bei einer Gruppe auf 4.5 %).
- Der Anteil des G-AK-Proteins am Immunglobulin der Klasse G bewegt sich bei dysg. Hühnern zwischen 0-10 %.

Eine solch große Spanne wird bei keiner anderen Immunglobulinklasse dysgammaglobulinämischer Hühner und auch nicht bei Kontrollhühnern gefunden. Bei einigen Gruppen dysg. Hühner konnten keine G-AK festgestellt werden. Auch innerhalb von Gruppen mit G-AK-Produktion ist, aufgrund des individuellen Verhaltens der dysg. Hühner, mit einzelnen Tieren ohne G-Antikörperproduktion zu rechnen.

3.2. Vergleich der Immunglobulin- bzw. Antikörper-serumspiegel, ab dem 28. Tag nach Immunisierung mit B.pertussis, B.abortus und HSA, ohne bzw. mit zusätzlicher FCA-Gabe

Von mehreren Autoren, u.a. STEINBERG et al. (29) und WANKER (35), wurde das Einsetzen der FCA-Wirkung erst ab der dritten Woche nach Immunisierung festgestellt. Aus diesem Grund wurden zum Vergleich der Immunisierungen, ohne bzw. mit zusätzlicher FCA-Gabe, nur die Sammelproben herangezogen, die Blutentnahmen ab dem 28. Tag nach Immunisierung enthalten.

In den Tabellen 13 - 15, sowie den Abbildungen 13 - 15 wird zunächst der FCA-Effekt bei den einzelnen Antigenen untersucht. In Tabelle 16 wird dann ein vereinfachtes Schema mit einem Vergleich der FCA-Wirkung bei den drei Antigenen gegeben.

Vergleich der Immunglobulin- bzw. Antikörperserumspiegel
ab dem 28. Tag nach Immunisierung mit Bordetella pertussis
ohne bzw. mit zusätzlicher FCA-Gabe (s. Abb.13 und Tab.13)

Tabelle 13

	IgA	IgG	IgM	A-AK	G-AK	M-AK
	mg/dl			mg/dl		
<u>Kontrolltiere</u>						
ohne FCA ¹⁾	83	1611	178	<0.2*	2.6	1.1
mit FCA ¹⁾	79	1647	222	0.4	4.3	1.1
FCA-Effekt (%)	95	102	125	200	165	100

Dysgammaglobulinämische Tiere

ohne FCA ²⁾	196	6	852	1.0	0.4	1.4
mit FCA ²⁾	246	39	1134	2.1	0.9	2.7
FCA-Effekt (%)	126	650	133	210	225	193

1) = Sammelprobe von 6 Tieren

2) = Sammelprobe von 5 Tieren

$$\text{FCA-Effekt \%} = \frac{[\text{Ig}] \text{ bzw. } [\text{AK}] \text{ von Gruppen mit FCA}}{[\text{Ig}] \text{ bzw. } [\text{AK}] \text{ von Gruppen ohne FCA}} \times 100$$

* Unter Berücksichtigung der Konzentrierung der Eluate nach der Affinitätschromatographie, ergibt sich 0.2 mg/dl als untere Grenze der Erfassbarkeit.

Zusätzliche FCA-Gabe bei der Immunisierung mit B.pertussis bringt bei Kontrollhühnern, im Ig-Bereich, keine nennenswerte Steigerung.

A- und G-Antikörper werden in etwa auf den doppelten Wert angehoben, während M-Antikörper nicht betroffen sind.

Dysg. Hühner reagieren im Ig-Bereich leicht auf die zusätzliche FCA-Gabe. Der Anstieg von 6 auf 39 mg/dl IgG, also um 650 %, sollte nicht überbewertet werden, da die absolute Zunahme nur 33 mg/dl beträgt und sich diese Werte, gemessen an der Norm, in sehr niedrigen Bereichen bewegen (<4% der Norm).

Im AK-Bereich führt die zusätzliche FCA-Gabe zur Verdoppelung der Antikörperquantitäten.

Ig-Protein
in mg/dl

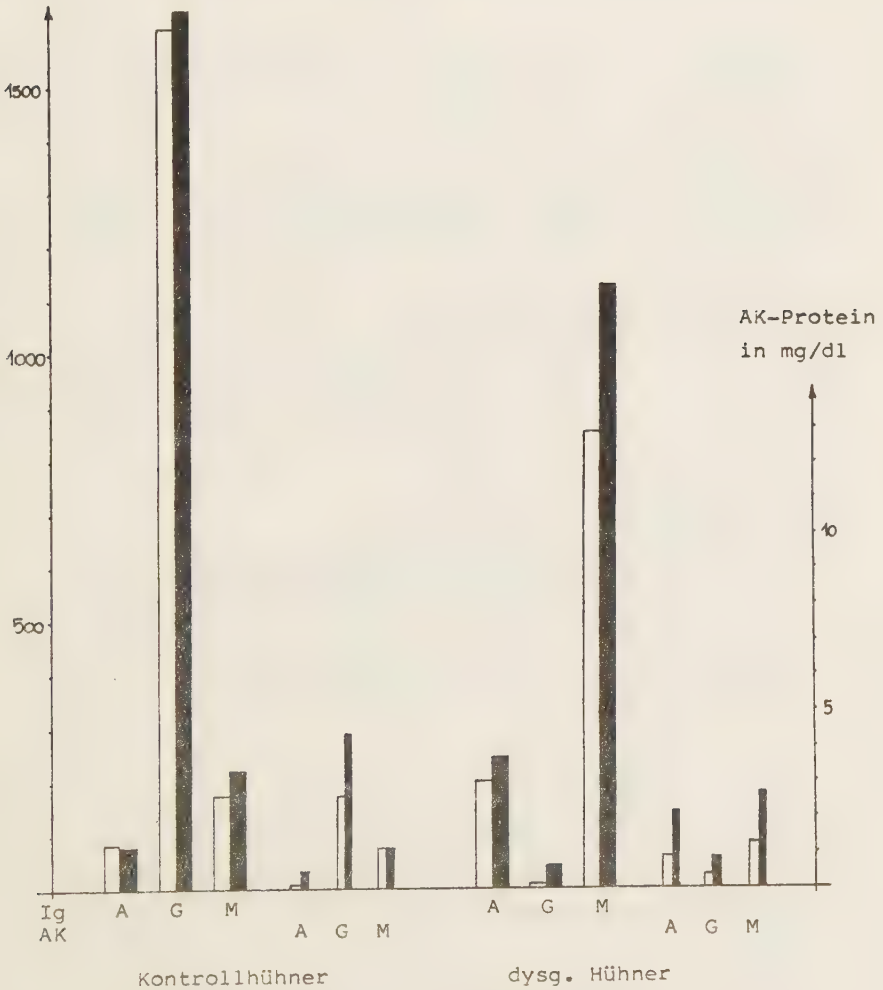


Abb.13 Vergleich der Immunglobulin- bzw. Antikörperspiegel nach Immunisierung mit Bordetella pertussis ohne ☐ bzw. mit ☒ zusätzlicher FCA-Gabe.

Vergleich der Immunglobulin- bzw. Antikörperserumspiegel
ab dem 28. Tag nach Immunisierung mit Brucella abortus
ohne bzw. mit zusätzlicher FCA-Gabe (s. Abb.14 u. Tab.14)

Tabelle 14

IgA	IgG	IgM	A-AK	G-AK	M-AK
	mg/dl			mg/dl	

Kontrolltiere

ohne FCA ¹⁾	82	688	97	0.3	1.6	1.0
mit FCA ²⁾	92	841	104	0.3	2.5	0.6
FCA-Effekt (%)	112	122	107	100	156	60

Dysgammaglobulinämische Tiere

ohne FCA ³⁾	169	12	623	1.4	<0.2*	1.9
mit FCA ⁴⁾	310	21	932	1.3	0.5	2.7
FCA-Effekt (%)	183	175	149	93	250	142

- 1) = Sammelprobe von 6 Tieren
 2) = 2 Sammelproben von 12 Tieren
 3) = 2 Sammelproben von 10 Tieren
 4) = Sammelprobe von 7 Tieren

$$\text{FCA-Effekt \%} = \frac{[\text{Ig}] \text{ bzw. } [\text{AK}] \text{ von Gruppen mit FCA}}{[\text{Ig}] \text{ bzw. } [\text{AK}] \text{ von Gruppen ohne FCA}} \times 100$$

* Unter Berücksichtigung der Konzentrierung der Eluate nach der Affinitätschromatographie, ergibt sich 0.2 mg/dl als unter Grenze der Erfassbarkeit.

Aus Tab. 14 und Abb. 14 ist zu ersehen, daß eine zusätzliche FCA-Gabe, zu der Immunisierung mit B.abortus, bei Kontrollhühnern nur beim IgG zu einer leichten Steigerung führt, und gleichermaßen im AK-Bereich beim G-Antikörper.

Dysg. Hühner reagieren im Ig-Bereich mit deutlichem Anstieg. Im AK-Bereich erzeugt sie eine meßbare G-Antikörperserumkonzentration im Gegensatz zur ohne FCA immunisierte Gruppe.

Ig-Protein
in mg/dl

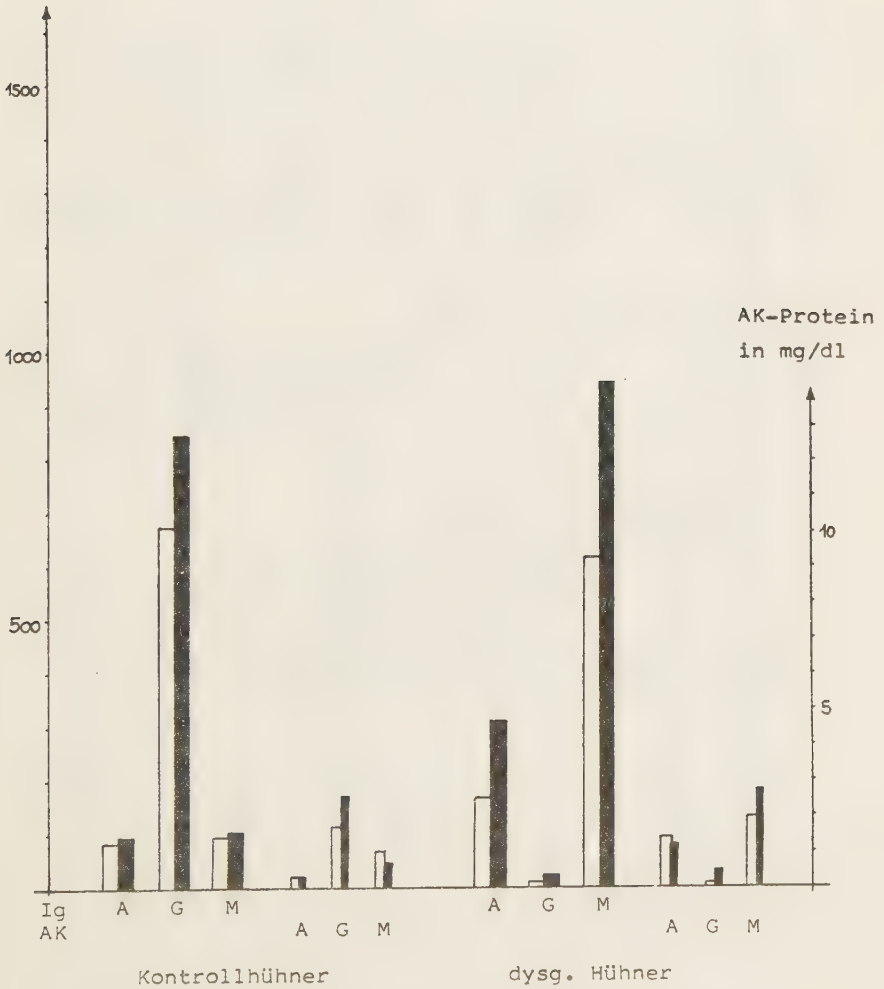


Abb.14 Vergleich der Immunglobulin- bzw. Antikörperspiegel nach Immunisierung mit Brucella abortus ohne □ bzw. mit ■ zusätzlicher FCA-Gabe.

Vergleich der Immunglobulin- bzw. Antikörperserumspiegel
ab dem 28. Tag nach Immunisierung mit HSA ohne bzw. mit
zusätzlicher FCA-Gabe (s. Abb.15 u. Tab.15)

Tabelle 15

IgA	IgG	IgM	A-AK	G-AK	M-AK
	mg/dl			mg/dl	

Kontrolltiere

ohne FCA ¹⁾	48	586	82	<0.2*	4.4	2.3
mit FCA ²⁾	62	963	112	1.9	12.9	2.9
FCA-Effekt (%)	129	164	137	950	293	126

Dysgammaglobulinämische Tiere

ohne FCA ³⁾	135	11	495	1.6	1.6	4.6
mit FCA ⁴⁾	247	14	887	9.8	2.0	27.2
FCA-Effekt (%)	129	127	179	613	125	591

- 1) = 2 Sammelproben von 11 Tieren
 2) = 4 Sammelproben von 22 Tieren
 3) = Sammelprobe von 5 Tieren
 4) = 6 Sammelproben von 18 Tieren

$$\text{FCA-Effekt \%} = \frac{[\text{Ig}] \text{ bzw. } [\text{AK}] \text{ von Gruppen mit FCA}}{[\text{Ig}] \text{ bzw. } [\text{AK}] \text{ von Gruppen ohne FCA}} \times 100$$

* Unter Berücksichtigung der Konzentrierung der Eluate nach der Affinitätschromatographie, ergibt sich 0.2 mg/dl als untere Grenze der Erfäßbarkeit.

Aus Tab. 15 und Abb. 15 ist zu ersehen, daß eine zusätzliche FCA-Gabe, zu der Immunisierung mit HSA, bei Kontrolltieren eine deutliche Steigerung im Ig-Bereich, am stärksten beim IgG, bewirkt.

Im AK-Bereich wird vor allem der G-AK-Spiegel stark angehoben und der A-AK-Spiegel in nachweisbare Meßbereiche geführt.

Dysg. Hühner reagieren auf zusätzliche FCA-Gabe im Ig-Bereich mit einem sehr starken IgA- und IgM-Anstieg. Im AK-Bereich übt zusätzliche FCA-Gabe eine potenzierende Wirkung auf A- und M-Antikörperspiegel aus.

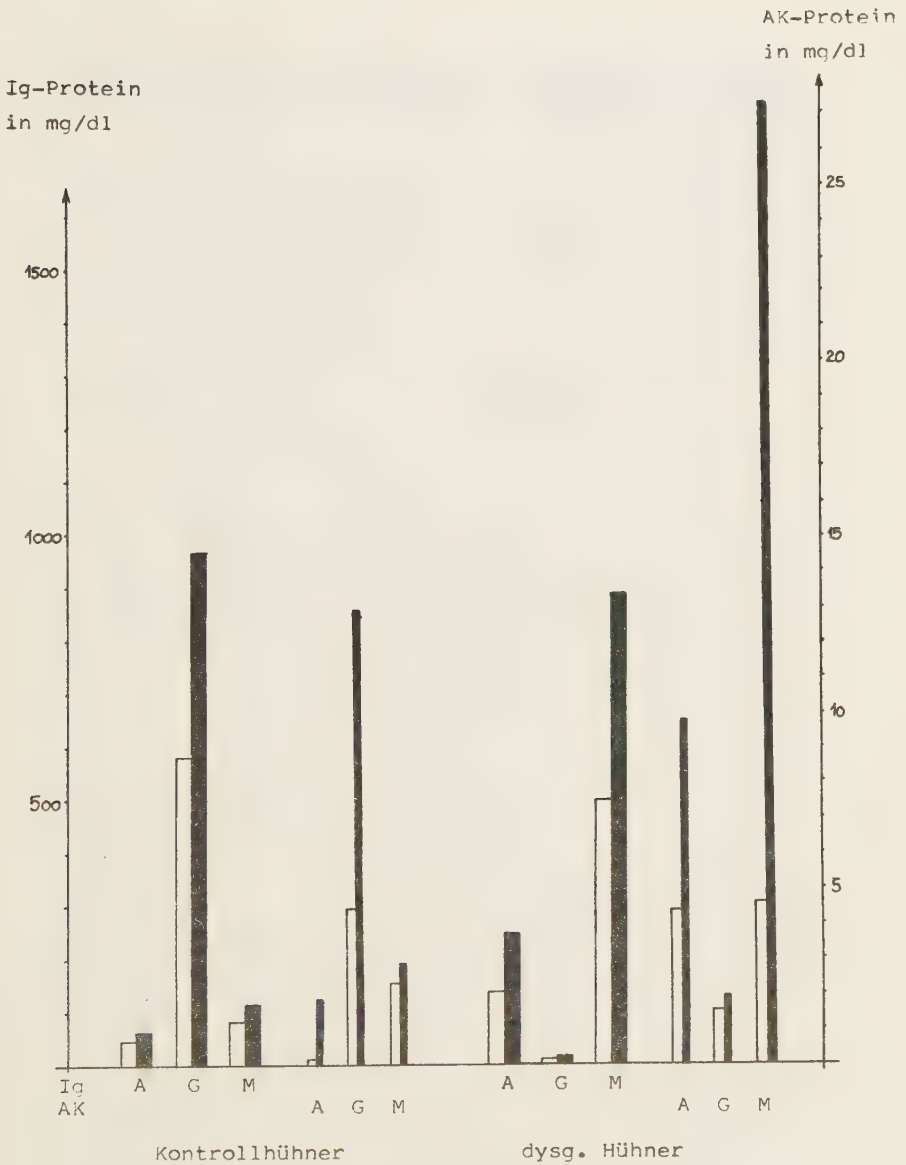


Abb.15 Vergleich der Immunglobulin- bzw. Antikörperspiegel nach Immunisierung mit Humanserumalbumin ohne □ bzw. mit ■ zusätzlicher FCA-Gabe.

Vereinfachtes Schema und Zusammenfassung zum Effekt nach zusätzlicher FCA-Gabe bei Immunisierung mit B.pertussis, B.abortus und HSA

In den Tabbl. 13-15 wird der FCA-Effekt in % ausgedrückt

$$\text{FCA-Effekt (\%)} = \frac{[\text{Ig}] \text{ bzw. } [\text{AK}] \text{ von Gruppen mit FCA}}{[\text{Ig}] \text{ bzw. } [\text{AK}] \text{ von Gruppen ohne FCA}} \times 100$$

Um das Ergebnis vereinfacht darzustellen, werden in Tabelle 16 folgende Symbole verwendet:

Ig-Bereich: - < 125 %

+ = 125-150 %

++ = 150-175 %

+++ > 175 %

AK-Bereich: - < 125 %

+ = 125-200 %

++ = 200-275 %

+++ > 275 %

Im Ig-Bereich erfolgen Veränderungen des Serumspiegels von einem bestimmten Grundniveau* aus, während die AK-Spiegel vom Nullniveau ansteigen. Aus diesem Grund muß die Bewertung des

FCA-Effekts im Ig-Bereich in engeren Grenzen, sprich Prozentschritten, als im AK-Bereich erfolgen.

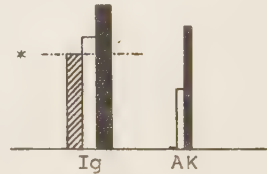


Tabelle 16

FCA-Effekt bei

IgA IgG IgM

A-AK G-AK M-AK

Bordetella pertussis

Kontrollhühner

- - -

+ + -

Dysg. Hühner

+ +++ +

++ ++ +

Brucella abortus

Kontrollhühner

- - -

- + -

Dysg. Hühner

+++ +++ +

- ++ +

Humanserumalbumin

Kontrollhühner

+ ++ +

+++ +++ +

Dysg. Hühner

+ + +++

+++ + +++

Tabelle 16 zeigt, daß die Versuchstiere nach Immunisierung mit Bordetella pertussis und Brucella abortus sowohl im Ig-, als auch im AK-Bereich (mit Ausnahme der A-Antikörper) gleichartig auf zusätzliche FCA-Gabe reagieren.

Bei Kontrolltieren kann zusätzliche FCA-Gabe zu B.pertussis und B.abortus im Ig-Bereich keine Steigerung und im AK-Bereich nur bei den G-Antikörpern (bei Immunisierung mit B.pertussis auch noch bei den A-Antikörpern) eine leichte Steigerung der Serumspiegel bewirken.

Bei dysgammaglobulinämischen Tieren führt zusätzliche FCA-Gabe im Ig-Bereich zu einer Steigerung in allen drei Immunglobulinklassen. Bei beiden Antigenen wird der auf niedrigem Niveau liegende IgG-Spiegel relativ stark angehoben. B.abortus + FCA vermag vor allem auch den IgA-Spiegel stark zu heben.

Im AK-Bereich kann FCA eine starke Steigerung der G-Antikörper, bzw. eine leichte Steigerung der M-Antikörper auslösen. Der A-AK-Spiegel verhält sich unterschiedlich; während FCA zusätzlich zu B.pertussis einen kräftigen Anstieg auslöst, zeigt FCA zusätzlich zu B.abortus keinen Effekt.

Verglichen mit dem Effekt bei den Antigenen B.pertussis und B.abortus, zeigt zusätzliche FCA-Gabe, bei der Immunisierung mit Humanserumalbumin eine ungleich größere Wirkung auf die Ig- und AK-Serumspiegel.

Kontrolltiere reagieren im gesamten Ig-Bereich mit einer Steigerung; vor allem wird der IgG-Spiegel stark angehoben.

Im AK-Bereich kommt es zur deutlichen Einflußnahme von FCA, die sich in einer sehr starken A- und G-Antikörperzunahme ausdrückt.

Bei dysgammaglobulinämischen Tieren führt zusätzliche FCA-Gabe, bei Immunisierung mit RSA, zu einer Steigerung aller drei Immunglobulinklassen. Vor allem wird der IgM-Spiegel stark angehoben.

Im gesamten AK-Bereich bewirkt FCA eine Erhöhung der Serumspiegel. Besonders stark werden die A- und M-Antikörper angehoben.

3.3. Vergleich der Antigene B.pertussis, B.abortus
und HSA, hinsichtlich ihrer Immunogenität, mit
und ohne Adjuvansgabe (s. Abb. 16)

In diesen Vergleich gehen die Mittelwerte der Antikörperspiegel aller Sammelproben aus den 21 Versuchstiergruppen ein. Die Unterteilung erfolgt nach Immunisierung mit B. pertussis, B.abortus bzw. HSA. Ferner wird in die Gruppe "ohne FCA-Gabe" bzw. "mit FCA-Gabe" unterschieden; in Abb. 16 werden diese Gruppen als Säulenpaare dargestellt.

Um feste Bezugspunkte zu haben, sollen die mittleren Antikörperspiegel von Kontroll- bzw. dysg. Hühnern, die mit B.pertussis ohne FCA immunisiert wurden, als Basiswerte dienen. Stark vereinfacht läßt sich dann sagen:

Im Vergleich zu B.pertussis, bewirkt B.abortus in etwa gleich hohe Antikörperspiegel bei Kontroll- und dysgammaglobulinämischen Tieren. Zusätzliche FCA-Gabe macht sich bei diesen beiden zellulären Antigenen nicht so gravierend bemerkbar (s. 3.2.), wie beim löslichen Antigen HSA. HSA ruft ohne Adjuvans gleiche bis doppelt so hohe Spiegel hervor, wie die Basiswerte. Zusammen mit Adjuvans, kommt es, bei Immunisierung mit HSA, zu einer Potenzierung der AK-Bildung: Bei Kontrollhühnern liegen die Antikörperspiegel etwa 3-fach, bei dysg. Hühnern etwa 9-fach über den Basiswerten.

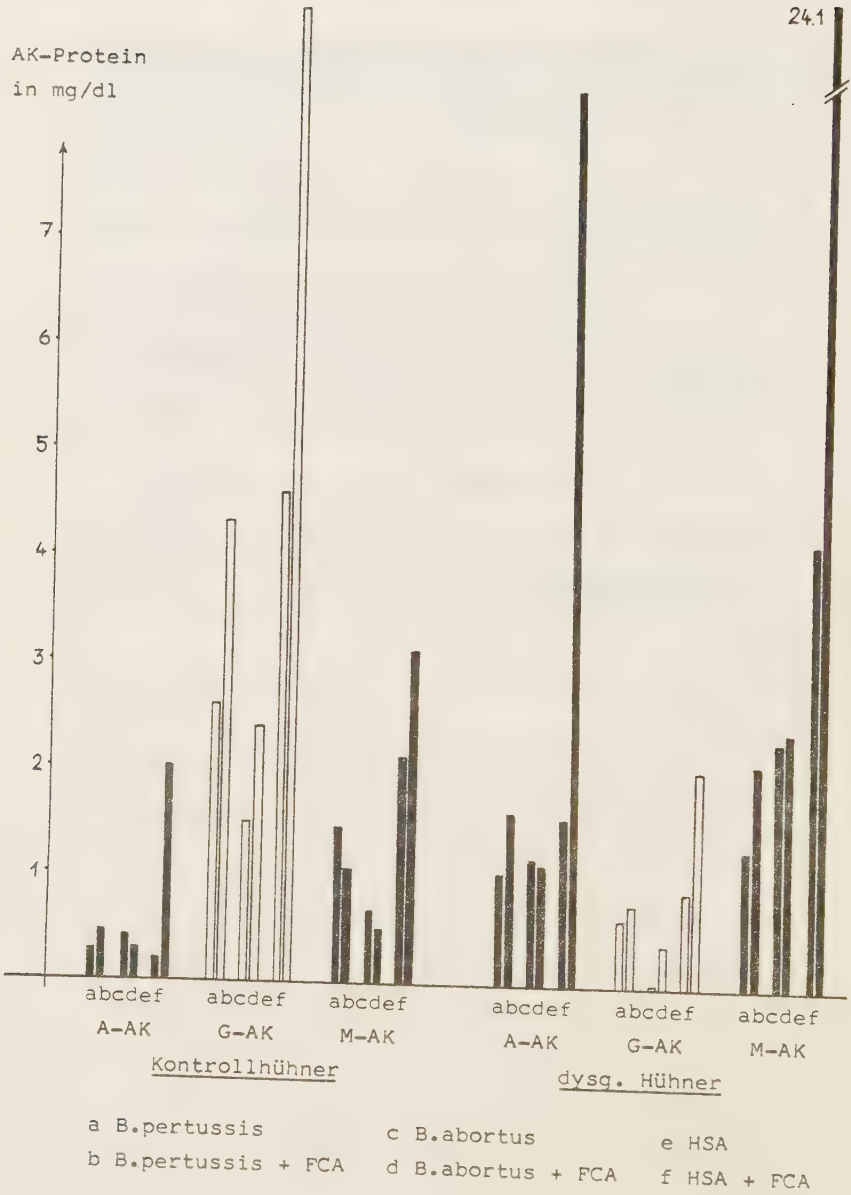


Abb.16 Antikörperkonzentrationen nach Immunisierung mit B.pertussis, B.abortus und HSA

3.4. Untersuchung zum Memoryeffekt bei Hühnern nach Immunisierung mit HSA und B.abortus

Bei der Verabreichung eines Adjuvans, wie unter Punkt

3.2. untersucht, werden T-Zellfunktionen betroffen.

Bei der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses spielen diese ebenfalls eine wesentliche Rolle, wie LAFRENZ et al. (17) zeigen. Ob immundefekte dysg. Hühner zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses fähig sind, soll im folgenden untersucht werden.

3.4.1. Memoryeffekt nach HSA-Applikation

Die Untersuchung mit HSA wurde bei dysgammaglobulinämischen und bei normogammaglobulinämischen Hühnern durchgeführt. Es wurde jeweils eine Gruppe von Hühnern mit 40 mg/kg HSA i.m. vorimmunisiert, um eine Gedächtnisbildung anzuregen. Drei Monate später erfolgte eine Immunisierung i.v. mit 100 µg/kg HSA. 5, 7 und 9 Tage danach wurden Serumproben der Hühner auf Agglutinationstiter gegen HSA untersucht. Um einen auftretenden Effekt als Leistung einer Gedächtnisbildung bezeichnen zu können, wurde je eine dys- und normogammaglobulinämische Gruppe, die keine Vorimmunisierung aufwiesen, mit 100 µg/kg HSA i.v. immunisiert und ebenso auf Agglutinationstiter gegen HSA geprüft.

Die hohe Dosierung, 40 mg/kg, wurde gewählt, um eine möglichst starke Gedächtnisbildung anzuregen, die niedrige Dosis, 100 µg/kg, um ausschließlich den Memoryeffekt

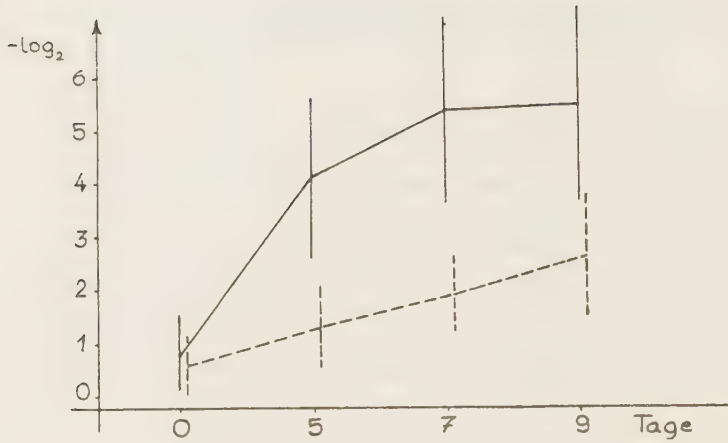


Abb. 17 Agglutinationstiter dysgammaglobulinämischer Hühner nach Immunisierung mit HSA

— vorimmunisierte Tiere
--- nicht vorimmunisierte Tiere

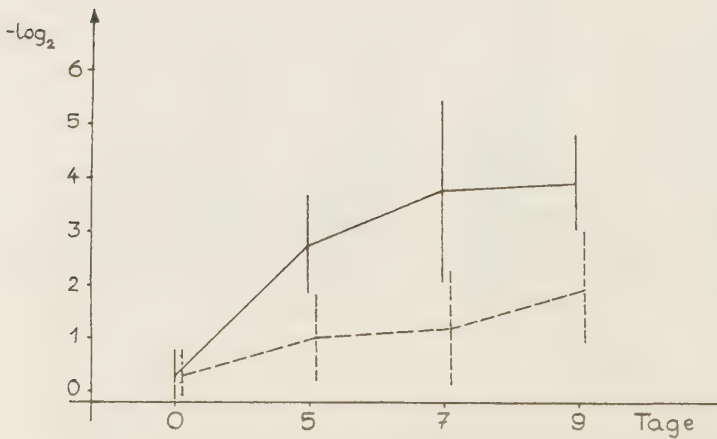


Abb. 18 Agglutinationstiter normogammaglobulinämischer Hühner nach Immunisierung mit HSA

— vorimmunisierte Tiere
--- nicht vorimmunisierte Tiere

zu erzielen.

Die Ergebnisse der dysg. Hühner (s. Tab.17 u. Abb.17) zeigen, daß nicht vorimmunisierte Tiere nur einen leichten Anstieg der Antikörpertiter nach Immunisierung mit 100 µg/kg HSA erfahren, vorimmunisierte Tiere dagegen einen starken Anstieg zeigen. Dieser Anstieg erfolgt zudem relativ schnell. Die Ergebnisse der normogammaglobulinämischen Hühner (s. Tab.18 u. Abb.18) zeigen ein ähnliches Ergebnis, wie die dysg. Hühner. Vorimmunisierte Tiere zeigen einen kräftigen Titeranstieg, während die Titer der nicht vorimmunisierten Tiere nur leicht ansteigen.

Aufgrund dieser Ergebnisse steht fest, daß dys- und normogammaglobulinämische Hühner nach Immunisierung mit HSA ein immunologisches Gedächtnis ausbilden und bei diesen Tieren nach einer erneuten Immunisierung ein Memoryeffekt zu beobachten ist.

Tab. 17 Agglutinationstiter dysgammag. Hühner
nach Immunisierung mit HSA

vorimmunisiert				
Tage	0	5	7	9
1735	0	3	5	5
Tier Nr. 36	1	5	6	6
40	1	6	6	7
41	0	5	7	6
44	0	4	7	7
45	1	2	2	2
461	2	2	3	3
1506	1	6	6	7
1511	1	4	6	6
$\bar{x}$	0.78	4.11	5.34	5.44
s	0.67	1.54	1.73	1.81

nicht vorimmunisiert				
Tage	0	5	7	9
25812	1	2	2	4
Tier Nr. 25	0	0	1	1
29	0	2	1	1
68	1	2	3	3
15	1	1	2	3
26	0	1	2	3
33	1	1	2	3
$\bar{x}$	0.57	1.29	1.86	2.57
s	0.53	0.76	0.69	1.13

Tab. 18 Agglutinationstiter normogammag. Hühner
nach Immunisierung mit HSA

vorimmunisiert				
Tage	0	5	7	9
1630	0	2	2	3
Tier Nr. 31	0	3	3	5
32	0	2	3	3
33	1	4	7	4
36	0	2	3	3
38	0	2	3	4
39	1	4	5	5
$\bar{x}$	0.29	2.71	3.71	3.86
s	0.49	0.95	1.70	0.90

nicht vorimmunisiert				
Tage	0	5	7	9
25836	0	0	0	1
Tier Nr. 49	0	1	1	2
65	0	1	1	2
71	0	2	2	3
6	1	1	1	2
16	0	0	0	0
41	1	2	3	3
$\bar{x}$	0.29	1.00	1.14	1.86
s	0.49	0.82	1.07	1.07

3.4.2. Untersuchung zum Memoryeffekt nach Brucella abortus-Applikation

In dem Kapitel wird untersucht, ob dysgammaglobulinämische Hühner nach Immunisierung mit dem zellulären Antigen B. abortus zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses fähig sind und in wie weit dies dosisabhängig ist. Zu diesem Zweck wurden Hühner mit 2×10^9 Brucellen/kg i.m. vorimmunisiert. Drei Monate später erfolgte eine Dreiteilung der Tiergruppe und eine Immunisierung mit 10^9 , 10^6 bzw. 10^5 Brucellen/kg. Drei nicht vorimmunisierte Gruppen dysgammaglobulinämischer Hühner erhielten dieselben Dosen. 5, 7 und 9 Tage danach wurden Blutproben entnommen und die Agglutinationstiter gegen B. abortus (s. 2.7.3.) bestimmt.

Die Ergebnisse (s. Abb.19 und Tab.19) zeigen, daß mit einer Dosierung von 10^5 Brucellen/kg weder bei der vorimmunisierten noch bei der nicht vorimmunisierten Gruppe ein Titeranstieg festzustellen ist. 10^6 und 10^9 Brucellen/kg bewirken jeweils einen Titeranstieg. Der Anstieg bei der nicht vorimmunisierten Gruppe übertrifft in beiden Fällen sogar noch den der vorimmunisierten Gruppe.

Aufgrund dieser Ergebnisse wird festgestellt, daß dysgammaglobulinämische Hühner nach Immunisierung mit dem zellulären Antigen B. abortus kein immunologisches Gedächtnis ausbilden und nach erneuter Applikation von B. abortus keinen Memoryeffekt zeigen.

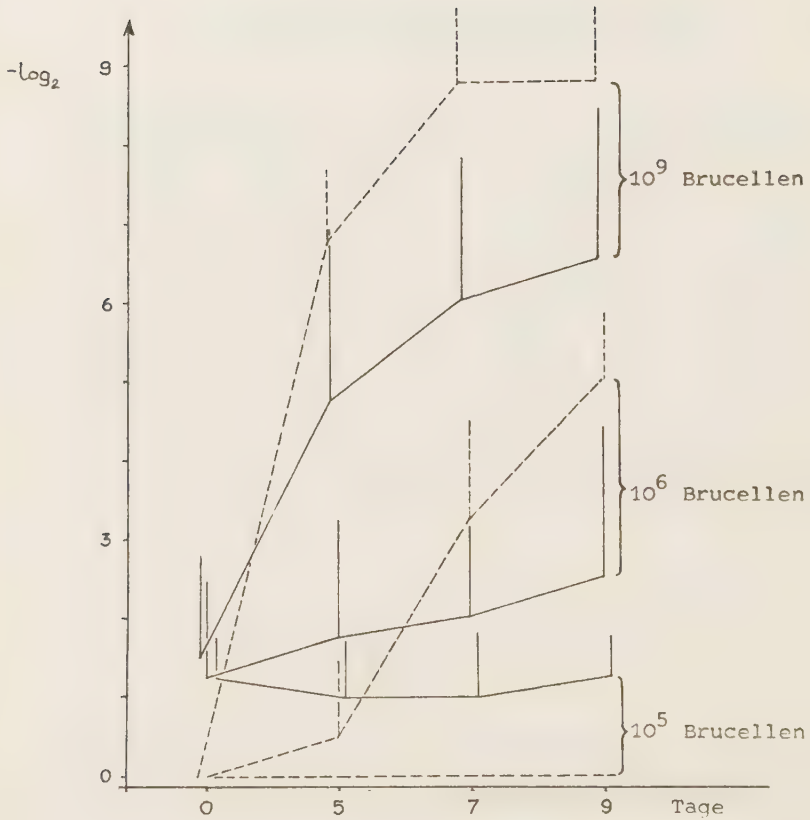


Abb. 19 Agglutinationstiter dysgammag. Hühner bei der Untersuchung zum Memoryeffekt nach Applikation verschiedener Dosen von Brucellen

— vorimmunisierte Tiere
---- nicht vorimmunisierte Tiere

Tab. 19 Agglutinationstiter bei dysgammaglobulinä-
mischen Hühnern, nach B.abortus Applikation

10^9 Brucellen/kg

vorimmunisiert					
Tage	0	5	7	9	
Tier Nr. 2	1	4	5	5	
3	0	6	7	7	
7	3	7	8	9	
34	2	2	4	5	
$\bar{x}$	1.5	4.8	6.0	6.5	
s	1.3	2.2	1.8	1.9	

nicht vorimmunisiert					
Tage	0	5	7	9	
Tier Nr. 1	0	7	8	8	
32	0	6	10	10	
39	0	8	8	8	
47	0	6	9	9	
$\bar{x}$	0.0	6.8	8.8	8.8	
s	0.0	1.0	1.0	1.0	

10^6 Brucellen/kg

vorimmunisiert					
Tage	0	5	7	9	
Tier Nr. 43	1	3	3	4	
59	0	1	1	0	
72	1	0	1	2	
78	3	3	3	4	
$\bar{x}$	1.3	1.8	2.0	2.5	
s	1.3	1.5	1.2	1.9	

nicht vorimmunisiert					
Tage	0	5	7	9	
Tier Nr. 54	0	0	2	4	
57	0	2	5	6	
60	0	0	3	5	
77	0	0	3	5	
$\bar{x}$	0.0	0.5	3.3	5.0	
s	0.0	1.0	1.3	0.8	

10^5 Brucellen/kg

vorimmunisiert					
Tage	0	5	7	9	
Tier Nr. 17	1	0	1	1	
23	2	2	2	2	
35	1	1	0	1	
48	1	1	1	1	
$\bar{x}$	1.3	1.0	1.0	1.3	
s	0.5	0.8	0.8	0.5	

nicht vorimmunisiert					
Tage	0	5	7	9	
Tier Nr. 12	0	0	0	0	
25	0	0	0	0	
29	0	0	0	0	
68	0	0	0	0	
$\bar{x}$	0	0	0	0	
s	0	0	0	0	

4. Diskussion

4.1. Besprechung der Methoden

Die Affinitätschromatographie zum Darstellen der Antikörper gegen spezifisches Antigen wurde erstmals von LOWE und DEAN (21) beschrieben. Die Möglichkeit, Antikörperprotein in Reinform darzustellen, erlaubt eine quantitative Einschätzung der Antikörperserumkonzentrationen, im Vergleich zu den Immunglobulinkonzentrationen. Mit der Untersuchung des eingeeengten "Perfusats" (Wascheluat), die einen negativen Antikörperbefund ergab, wurde bewiesen, daß sämtliche spezifische Antikörper einer Probe auf den Bindungsstellen des Antigen-Sepharose-Komplexes haften bleiben. Aufgrund dieser Überprüfungen, die bei mit HSA immunisierten Gruppen durchgeführt wurden, kann angenommen werden, daß die Kapazität der Säule, bei 50-100 mg gebundenen Antigen, für eine maximal aufgetragene Antikörperproteinmenge von 6 mg voll ausreicht.

Die Messung der Antikörperspiegel, mittels der passiven Hämagglutination bzw. der direkten Agglutination, stellt eine Titerbestimmung dar; absolute Antikörperproteinkonzentrationen können mit ihr nicht bestimmt werden; sie wird deshalb bei Verlaufsuntersuchungen eingesetzt.

Um die Ergebnisse der Affinitätschromatographie und der radialen Immundiffusion mit denen der Agglutinationstiterbestimmung, mit und ohne ME-Behandlung, vergleichen zu können, wurde diese Methode bei den Sammelproben ebenfalls durchgeführt. Es ergab sich eine weitgehende Über-

einstimmung der Ergebnisse; so wiesen Kontrolltiere hohe ME-resistente Titer auf, wenn in der radialen Immundiffusion hohe Konzentrationen von G-Antikörpern gemessen wurden, und dysgammaglobulinämische Tiere zeigten hohe Gesamttiter, bei niedrigen ME-resistenten Titern, wenn die radiale Immundiffusion hohe M-AK-Konzentrationen ergab. Nur bei einigen Serumproben von dysgammaglobulinämischen Tieren, waren die Ergebnisse nicht übereinstimmend. Sie wiesen in der Agglutinationstiterbestimmung hohe Titer vor ME-Behandlung und Nulltiter nach ME-Behandlung auf (s. Tab.9 u. 10). In der radialen Immundiffusion zeigten sie jedoch nicht nur hohe M-AK-Konzentrationen, sondern auch meßbare G- und A-AK-Konzentrationen. Es gibt dafür zwei mögliche Erklärungen:

1. Die Reduktion von SH-Gruppen durch 2-ME beschränkt sich nicht nur auf IgM-Antikörper; CAPEL et al. (4) beschreiben die Zerstörung von IgG-Antikörpern durch Merkaptoäthanol bei IgG-armen Seren nackter Mäuse. Auch beim Haushuhn sind G-Antikörper, zwar weit weniger als M-Antikörper, gegen ME-Reduktion empfänglich, aber nicht resistent (ZIJPP (37) und SZENBERG et al. (30)). Bei dysgammaglobulinämischen Tieren, mit sehr niedrigen IgG-Spiegeln, fehlt möglicherweise die "Pufferaktivität" gegen die ME-Einwirkung. Die wenigen sonst "resistenten" Antikörper können unter bestimmten Bedingungen durch ME inaktiviert werden.

2. G- und A-Antikörper liegen möglicherweise unter der Grenze der Erfassbarkeit der Agglutinationsmethoden.

4.2. Besprechung der Ergebnisse

Entsprechend den einleitend formulierten Fragestellungen, lassen sich aufgrund der vorliegenden Ergebnisse die vier folgenden Komplexe diskutieren:

1. Sowohl bei Kontrolltieren als auch dysgammaglobulinämischen Tieren bewegt sich der Anteil des Antikörperproteins am Immunglobulinprotein nach Immunisierung mit B. abortus oder B.pertussis zwischen 0.2-0.4 % und nach Immunisierung mit HSA zwischen 0.9-3.3 %. Bei Serumproben dysgammaglobulinämischer Hühner konnten G-Antikörper festgestellt werden. Der Anteil der G-AK am IgG betrug in einigen Fällen bis zu 10 %, während auch Fälle ohne meßbaren G-AK-Anteil auftraten. Dysgammaglobulinämische Tiere sind fähig Antikörpermengen in der gleichen Größenordnung wie Kontrolltiere zu produzieren, mit dem Unterschied, daß sie vor allem Antikörper der Immunglobulinklasse M synthetisieren, während Kontrolltiere überwiegend G-Antikörper aufweisen (s.3.1.).

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen diejenigen von WANKE (35), der für beide Tiergruppen vergleichbare Gesamtagglutinationstiter fand, wobei bei Kontrolltieren ME-resistente Antikörper, bei dysgammaglobulinämischen Tieren ME-sensitive Antikörper, den Hauptanteil an der Antikörperantwort stellten. WANKE machte für die ME-resistenten Titer der dysgammaglobulinämischen Tiere deren A-Antikörperspiegel verantwortlich. Vorliegende Ergebnisse machen deutlich, daß bei dysgammaglobulinämi-

schen Tieren A-Antikörper den Hauptanteil am ME-resistenten Titer tragen, daß jedoch auch bei diesen Tieren in Einzelfällen G-Antikörper auftreten können, wenn auch nur in begrenztem Umfang.

Von den Ergebnissen der UCD 140 Linie dysgammaglobulinämischer Hühner ausgehend, nehmen CHANH et al. (5) an, daß diese Tiere über T-Suppressorzellen verfügen, die selektiv die IgG-Synthese hemmen. COOPER et al. (7) erreichen durch perinatale Bursektomie bei Küken eine Dysgammaglobulinämie mit stark verminderter IgG-Antikörperantwort und führen dies auf ein partielles B_G-Zelldefizit zurück. Die im Vergleich zu Kontrolltieren überschießende IgM-Antwort erklären sie mit einer mangelnden negativen feedback Hemmung der IgM-Antwort durch IgG.

In vorliegender Arbeit zeigt sich das charakteristische Immunglobulinmuster der Kontrolltiere bzw. der dysgammaglobulinämischen Tiere (19) auch im Antikörperbereich; nämlich bei ersteren mit dem Vorherrschen von IgG, bei letzteren mit dem Vorherrschen von IgM. Bei mehreren Gruppen von dysgammaglobulinämischen Tieren konnten G-Antikörper festgestellt werden. Die von CHANH et al. (5) erwähnten Suppressorzellen oder der, von LÖSCH et al. (19) postulierte, unausgereifte B_G-Pool führen also nicht zu einem absoluten Fehlen von G-Antikörpern.

Die Betrachtung der AK-Anteile am Immunglobulin, wie oben gezeigt, läßt erkennen, daß die produzierten Antikörper nur einen Bruchteil des Immunglobulinproteins ausmachen.

Nach Verabreichung eines Antigens werden sowohl AK-produzierende als auch solche Ig-produzierende Zellen angeregt, deren Antikörper mit dem zur Immunisierung eingesetzten Antigen nicht binden; im Fall der zellulären Antigene scheinen dies vor allem die zuletzt beschriebenen Zellen zu sein. Wie aus Tabelle 16 zu ersehen ist, verlaufen die Ig- und AK-Konzentrationen nach Antigen- und Adjuvansstimulierung nicht vollkommen parallel. Auch ROSENBERG und CHILLER (26) finden, daß die Aktivierung von AFC (antigen forming cells) und IgFC (Ig forming cells) zwar eng miteinander verbunden ist, die Abläufe sich jedoch in ihrer jeweiligen Kinetik unterscheiden.

Untersuchungen von WHITE (36) ergaben, nach Immunisierung von Hühnern mit 40 mg HSA, Spitzenwerte der Antigenbindungskapazität von 3 mg/dl (gemessen mit dem FARR-Test).

2. Im Antikörperbereich wirkt sich eine zusätzliche Gabe von FCA (s.3.2.) nach Immunisierung mit HSA deutlich aus (bei Kontroll- und bei dysg. Tieren). Nach der Immunisierung mit B.pertussis bzw. B.abortus kann FCA bei Kontrolltieren keine Steigerung der Antikörperproduktion bewirken; bei dysgammaglobulinämischen Tieren kommt es nur bei Antikörpern der IgG-Klasse zu einem relativ starken FCA-Effekt.

Eine Adjuvanswirkung auf den Immunglobulinspiegel läßt sich in starkem Maße bei der Immunisierung mit HSA + FCA feststellen, während bei der Immunisierung mit B.pertussis bzw. B.abortus + FCA, diese Adjuvanswirkung zwar

feststellbar ist, aber nicht so stark zum Tragen kommt.

Von TAM und BENEDICT (32) wird die Wirkungsweise von FCA als ein Sensibilisieren von T-Lymphozyten gesehen, die im Kontakt mit den Mykobakterien des FCA lösliche Faktoren freisetzen, die wiederum B-Zellen zu einer intensiven 7S Ig-Synthese anregen. Dieses Immunglobulin ist überwiegend nicht gegen *Mc.tuberculosis* gerichtet. Die Autoren nennen es "unspezifisches" Immunglobulin.

WAKSMAN (34) sieht die FCA-Stimulierung als eine polyklonale B-Zellaktivierung durch Vermittlung von T-Helferzellen. In Abwesenheit von T-Zellen kann er bei FCA keinen Adjuvanseffekt beobachten. Die angeregten B-Zellen synthetisieren denjenigen Antikörper, zu dessen Bildung sie aufgrund ihrer Differenzierung in der Lage sind. Daher steigert FCA vor allem auch die Synthese von Antikörpern gegen ein gleichzeitig verabreichtes Antigen.

B.abortus und *B.pertussis* besitzen eine Oberflächenstruktur, mit sich ständig wiederholenden Determinanten; sie erfüllen damit, laut WAKSMAN (34), die Bedingungen für ein T-unabhängiges Antigen. COUTINHO und MÖLLER (8) sehen die Struktur dieser T-unabhängigen Antigene als Grund für deren mitogene Eigenschaften. Eine mögliche Induktion einer antigenspezifischen Immunantwort schließen sie nicht aus.

Betrachtet man die Ergebnisse nach Immunisierung mit den T-unabhängigen Antigenen *B.pertussis* und *B.abortus* bzw. mit dem T-abhängigen HSA, jeweils mit und ohne FCA-Gabe,

so kommt man zu demselben Schluß wie COUTINHO und MÖLLER, nämlich daß FCA eine dem Eigenadjuvanseffekt zellulärer Antigene verwandte mitogene Wirkung mit polyklonaler Aktivierung von B-Zellen (allerdings über T-Zellvermittlung) besitzt. Aus diesem Grund macht sich die FCA-Gabe bei den zellulären Antigenen nur in abgeschwächter Form bemerkbar und kann nicht mehr, wie im Fall von HSA, latente Potenzen zur AK- bzw. Ig-Bildung anregen.

DEL GUERCIO (9) findet, daß FCA keine verstärkende Wirkung auf die IgM-AK-Antwort gegenüber einem T-zellabhängigen Antigen aufweist. Bei Kontrolltieren kann dies bestätigt werden (s. Tab.16); dysgammaglobulinämische Tiere jedoch reagieren im IgM-AK-Bereich auf die FCA-Gabe nach Immunisierung mit dem T-abhängigen Antigen HSA.

Aufgrund unserer Ergebnisse muß man davon ausgehen, daß der Immundefekt dysgammaglobulinämischer Hühner im Bereich des B_G-Zellpools zu suchen ist (u.a. mit einer mangelhaften negativen Rückkopplung der IgM-Synthese).

Setzt man WAKSMANS (34) Annahme einer T-zellvermittelten FCA-Wirkung voraus, so scheint der Defekt nicht im Bereich der T-Helferzellen zu liegen, da die FCA-Wirkung auch bei dysgammaglobulinämischen Hühnern festzustellen ist (s. Tab.15).

Ein Einfluß auf das Serumproteinmuster durch FCA, wie es TAM und BENEDICT (32) feststellten, liegt auch bei unseren Versuchstieren nahe (s. Tab. 9-12 Immunglobulin- und Gesamtprotein). TAM und BENEDICT finden eine Abnahme der Albuminkonzentration, während die Globuline, und hier be-

sonders die Gammaglobuline, ansteigen. Bei unseren Versuchsgruppen, die mit HSA + FCA immunisiert wurden, kam es zu einem deutlichen Ansteigen der Ig-Spiegel, jedoch zu keiner nennenswerten Steigerung des Gesamtproteins. Dies läßt dasselbe Phänomen des Antagonismus der Serumproteine vermuten, welche letztlich die Homeostase des kolloidosmotischen Drucks aufrecht erhält.

3. Es wird eine Gleichwertigkeit von B.pertussis und B.abortus hinsichtlich ihrer Immunogenität festgestellt, d.h. ihrer Potenz die Antikörperbildung anzuregen (s. 3.3.). HSA ruft eine höhere Antikörperbildung hervor, die, im Gegensatz zu den zellulären Antigenen, durch zusätzliche Adjuvansgabe noch vervielfacht werden kann.

Die Immunogenität von Antigenen wird u.a. davon bestimmt, wieviel Antigen determinanten sie auf ihrer Oberfläche bzw. auf ihrem Molekülkomplex aufweisen (8). Da B.pertussis und B.abortus, wie schon öfters erwähnt, wenige immer wiederkehrende Determinanten besitzen, sprechen sie weniger Zellklone zur AK-Bildung an, als das komplizierter gebaute HSA-Molekül.

4. Dysgammaglobulinämische Hühner zeigen eine Gedächtnisbildung nach Immunisierung mit dem T-abhängigen Antigen HSA, dagegen nicht nach Immunisierung mit dem T-unabhängigen Antigen B.abortus (s.3.4.).

TAKAOKI und KAWAGUCHI (31) haben bei Mäusen ein immunolo-

gisches Gedächtnis nachgewiesen. Sie entwickelten ein Modell der Immunozytendifferenzierung nach Antigenstimulierung (X-Y-Z-Modell), wobei Memory-Y-Zellen reifungsmäßig zwischen jungfräulichen, immunologisch kompetenten X-Zellen, die nie antigenstimuliert wurden, und Antikörperproduzierenden Z-Zellen liegen.

BLAZKOVEC und WOLFE (3) fanden ein immunologisches Gedächtnis bei Hühnern nach Immunisierung mit HSA und zwar ein von M-AK getragenes Gedächtnis von kurzer Dauer, das sich schnell schon bei niedrigen Dosen von HSA entwickelt, und ein von G-AK getragenes Gedächtnis, das sich nach mittleren und hohen Dosen von HSA ausbildet.

LAFRENZ und FELDBUSH (17) betrachten T-Helferzellen zur Ausbildung von hochaffinen Memoryzellen für unbedingt nötig.

DROEGE und MALCHOW (12) untersuchten bei Hühnern den Einfluß von Thymektomie und Variation der Antigendosis auf die Antikörperantwort gegen B.abortus und gegen Kaninchenerythrozyten 7 bzw. 14 Tage nach Immunisierung. Sie fanden, daß die IgG-Produktion stärker T-abhängig ist als die IgM-Produktion und daß große Antigendosen (10^{10} Brucellen), im Gegensatz zu niedrigen Dosen (10^7 Brucellen), den suppressiven Effekt der Thymektomie (d.h. den Wegfall der T-Zellhilfe) besser kompensieren können. Eine AK-Bildung gegen die T-abhängigen Kaninchenerythrozyten konnte nur bei nicht thymektomierten Kontrolltieren festgestellt werden.

Bei vorliegender Untersuchung zum Memoryeffekt nach Im-

munisierung mit B.abortus bei dysg. Hühnern kann die Dosisabhängigkeit der AK-Antwort bestätigt werden. Eine Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses und ein Memoryeffekt nach erneuter Immunisierung kann bei diesem T-unabhängigen Antigen nicht festgestellt werden. Das T-abhängige Antigen HSA induziert die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses bei B19 Hühnern (Tab.17 u. 18).

Die angeführten Ergebnisse nach Immunisierung mit B.abortus und HSA führen zu dem Schluß, daß der Immundefekt der dysgammaglobulinämischen Hühner nicht durch mangelnde T-Zellhilfe verursacht wird, sondern in einer Störung auf der B-Zellebene zu suchen ist.

5. Zusammenfassung

Kontrollhühner und dysgammaglobulinämische Hühner der UM B19 Linie wurden mit Bordetella pertussis, Brucella abortus und Humanserumalbumin (HSA), mit und ohne Adjuvanzusatz, immunisiert und die Auswirkung auf Immunglobulinprotein bzw. Antikörperprotein gemessen.

1. Das nach Immunisierung gebildete Antikörperprotein stellt nur einen Bruchteil des Immunglobulinproteins dar. Zumindest einzelne dysgammaglobulinämische Hühner sind, entgegen bisheriger Erkenntnisse, zur IgG-Antikörpersynthese fähig, wenn auch in sehr begrenztem Umfang.
2. Eine zusätzliche Gabe von Freundschem kompletten Adjuvans (FCA) wirkte sich im Antikörperbereich nur bei Immunisierung mit dem T-abhängigen Antigen HSA in ausgeprägter Form aus. Kontrolltiere reagierten hier mit einem starken Anstieg der IgG-Antikörper, während dysgammaglobulinämische Tiere noch höhere IgA- bzw. IgM-Antikörpersteigerungen zeigten. Bei den T-unabhängigen Antigenen Bordetella pertussis und Brucella abortus macht sich eine zusätzliche FCA-Gabe zwar bemerkbar, der Effekt ist allerdings weit geringer als bei HSA.
3. Ein Vergleich der Antigene hinsichtlich ihrer Immunogenität ergibt eine Gleichwertigkeit von Bordetella pertussis und Brucella abortus.

HSA bewirkt gegenüber diesen eine doppelt so hohe Antikörperbildung, die durch Adjuvansgabe noch vervielfacht werden kann.

4. Ein Memoryeffekt bei Hühnern der UM B19 Linie läßt sich nach Immunisierung mit dem T-abhängigen Antigen HSA beobachten, jedoch nicht nach Immunisierung mit dem T-unabhängigen Antigen Brucella abortus.

6. Summary

Control chickens and dysgammaglobulinemic chickens of the UM B19 line were immunized with Bordetella pertussis, Brucella abortus and human serum albumin (HSA), with and without adjuvant addition, and the effect on immunoglobulin protein- respectively antibody protein-levels was measured.

1. The amount of antibody protein produced by immunization represents only a fraction of the immunoglobulin protein. Contrary to present knowledge some individual dysgammaglobulinemic chickens are able to produce IgG-antibodies in a limited range, however.
2. The further addition of Freund's complete adjuvant (FCA) significantly influenced the antibody levels only after immunization with the T-cell dependent antigen HSA. In this case control chickens showed an intense rise in IgG-antibodies, whereas dysgammaglo-

bulinemic chickens showed a sharper increase in IgA- and IgM-antibody levels. Using the T-cell independent antigens *Bordetella pertussis* and *Brucella abortus*, the influence of a further addition of FCA was observed, however its effect was far less than in the case of HSA.

3. Comparing the antigens with regard to their immunogenicity, *Bordetella pertussis* and *Brucella abortus* showed equal potential. HSA induces twice as large an increase in antibody production, which can be multiplied by addition of adjuvant.
4. A memory effect in chickens of the UM B19 line was observed after immunization with the T-cell dependent antigen HSA, but not after immunization with the T-cell independent antigen *Brucella abortus*.

7. Literaturverzeichnis

1. AVRAMAES, S., B. TAUDOU, and S. CHUILON
Glutaraldehyde, cyanuric chloride and tetraazotized O-dianisidine as coupling reagents in the passive hemagglutination test
Immunochemistry 6, 67 (1969)
2. BENEDICT, A.A., R.J. BROWN, and R. HERSH
Inactivation of high and low molecular weight chicken antibodies by mercaptoethanol
J. Immunol. 90, 399 (1963)
3. BLAZKOVEC, A.A., and H.R. WOLFE
Factors affecting the primary and secondary response to bovine serum albumin in chickens
Int. Arch. Allergy 26, 80 (1965)
4. CAPEL, P.J.A., P.G.G. GERLAG, J.F.H.M. HAGEMANN, and R.A.P KOENE
The effect of 2-mercaptoethanol on IgM and IgG antibody activity
J. Immunol. Methods 36, 77 (1980)
5. CHANH, T.C., A.A. BENEDICT, L.Q. TAM, H.APLANALP, and M.E. GERSHWIN
Inherited 7S immunoglobulin deficiency in chickens: presence of suppressor T cells that suppress synthesis of 7S immunoglobulin but not IgM
J. Immunol. 125, 108 (1980)
6. COOPER, M.D., R.D.A. PETERSON, and R.A. GOOD
Delineation of the thymic and bursal lymphoid systems in the chicken
Nature 205, 143 (1965)

7. COOPER, M.D., L.N. PETERSON, R.D.A. DENT, M.A. SOUTH,
and R.A. GOOD
The function of the thymus system and the bursa
system in the chicken
J. Exp. Med. 123, 75 (1966)
8. COUTINHO, A., and G. MÖLLER
B cell mitogenic properties of thymus independent
antigens
Nature New Biology 245, 12 (1973)
9. DEL GUERCIO, P.
Effect of adjuvants on the antibody response to a
hapten on a thymus independent carrier
Nature New. Biol. 238, 213 (1972)
10. DIAZ, R., and L.M. JONES
Radial immunodiffusion test with a brucella poly-
saccharide antigen for differentiating infected
from vaccinated cattle
J. Clin. Microbiol. 10, 37 (1979)
11. DRESSER, D.W., and I.M. PHILLIPS
The cellular targets for the action of adjuvants:
T adjuvants and B adjuvants
Ciba Found. Symp. Immunopotential 18, 3 (1973)
12. DROEGE, W., and D. MALCHOW
Thymus dependence of the antibody response in
chickens: variation with dose of antigens and
type of antibody affected
Eur. J. Immunol. 2, 35 (1972)

13. FIEDLER, H., U. LÖSCH, and K. HALA
Establishment of a B-compatible chicken line with normogammaglobulinaemia and dysgammaglobulinaemia
Folia biologica (Praha) 26, 17 (1980)
14. GAULTNEY, J.B., R.D. WENDE, and R.P. WILLIAMS
Microagglutination procedures for febrile agglutination tests
Appl. Microbiol., 22, 635 (1971)
15. GRUBER, F.
Studien zur Bestimmung der Immunglobulinspiegel am Beispiel normaler, gnotobiotischer und konventionalisierter Küken
Dissertation, München (1968)
16. KLUMPNER, W.
Verlaufsuntersuchungen über die postnatalen Immunglobulinkonzentrationen im Serum normo- und dysgammaglobulinämischer B12 Hühner
Dissertation, München (1980)
17. LAFRENTZ, A., and T.L. FELDBUSH
Role of T cells in the development of memory B cells. Quantitative and qualitative analysis
Immunology 44, 177 (1981)
18. LESLIE, G.A., and L.N. MARTIN
Studies on the secretory immunologic systems of fowl: III. Serum and secretory IgA of chicken
J. Immunol. 110, 1 (1973)
19. LÖSCH, U., I. KÜHLMANN, W. KLUMPNER, und H. FIEDLER
Course of serum-Ig concentrations in B12 chickens of the UM line
Immunobiol. 158, 416 (1981)

20. LÖSCH, U., R. WANKE, und M. MERKENSCHLAGER
Antikörper-Isotypen nach Immunisierung genuin dys-
gammaglobulinämischer UM B19 Hühner
Zbl. Vet. Med. A. 29, 365 (1982)
21. LOWE, C.R., and P.D.G. DEAN
The principles of affinity chromatography
in: Affinity Chromatography, WILEY and SONS,
London pp. 12-89 (1974)
22. MANCINI, G., A.O. CARBONARA, and J.F. HEREMANS
Immunochemical quantitation of antigens by single
radial immunodiffusion
Immunochemistry 2, 235 (1965)
23. MYERS, D.M., and A.A. SINIUK
Preliminary report on the development of an dif-
fusion-in-gel-method for the diagnosis of ram
epididymitis
Applied Microbiol. 19, 335 (1970)
24. NAGASE, F., I. NAKASHIMA, N. KATO, and K. YAGI
Studies on the immune response in chickens
I. Effect of various immunization procedures on
the primary and secondary antibody responses to
bovine serum albumin
Z. Immun.-Forsch. 154, 256 (1978)
25. V.N.
Affinity chromatography principles and methods
Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala Sweden
printed by Ljungföretagen AB, Örebro (1979)

26. ROSENBERG, Y.J., and Y.M. CHILLER
Ability of antigen-specific helper cells to effect
a class-restricted increase in total Ig-secreting
cells in spleens after immunization with the
antigen
J. Exp. Med. 150, 517 (1979)
27. SCHEIDEGGER, J.J.
Une micromethode de l'immune-électrophorèse
Int. Arch. Allergy. 7, 103 (1955)
28. STARKER, H.
Die Beeinflussung der Serum-Ig-Konzentration genuin
dysgammaglobulinämischer Hühner durch Freundsches
komplettes Adjuvans
Dissertation, München (1978)
29. STEINBERG, S.V., I.A. MUNRO, W.A. FLEMING, V.I. FRENCH
I.M. STARK, and R.G. WHITE
The influence of adjuvants on the immunological
response of chicken
Immunology 18, I. 635 (1970)
30. SZENBERG, A., P. LIND, and K. CLARKE
IgG and IgM antibodies in fowl serum
Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 43, 451 (1965)
31. TAKAOKI, M., and S. KAWAGUCHI
Transition in the charakter of immunological
memory in mice after immunization
Japan J. Microbiology 20, 255 (1976)
32. TAM, L.Q., and A.A. BENEDICT
Elevated 7S immunoglobulin and acute phase
proteins in adjuvant-injected chickens
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 150, 340 (1975)

33. TAYLOR, R.B., and H.H. WORTIS
Thymusdependence of antibody response: variation
with dose of antigen and class of antibody
Nature, (Lond.) 220, 927 (1968)
34. WAKSMAN, B.H.
Adjuvants and immune regulation by lymphoid cells
Springer Semin. Immunopathol. 2, 5 (1979)
35. WANKE, R.
Untersuchungen zur Immunantwort dysgammaglobuli-
nämischer Hühner der Linie UM B19
Dissertation, München (1982)
36. WHITE, R.G.
Immunopotential by mycobacteria in complete
Freund-type adjuvant as the failure of normal
immunological homeostasis
Ciba Found. Symp. Immunopotential 18, 47 (1973)
37. ZIJPP, van der A.J.
Genetic analysis of the humeral immune response of
white leghorn chickens
Poultry Science 59, 1363 (1980)

Herrn Professor Dr. U. Lösch möchte ich hiermit meinen besonderen Dank aussprechen für die Überlassung des Themas und für seine hilfsbereite Unterstützung und instruktive Anleitung bei dieser Arbeit.

Zugleich danke ich auch Herrn Prof. Dr. M. Merkschlager und Herrn Prof. Dr. H. Zucker für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Schließlich danke ich den Mitarbeitern des Labor Lösch, besonders Frau Dr. Kühlmann, Frau Dr. Schraner und Herrn Dr. Wanke, herzlich für ihre Unterstützung.

Lebenslauf

10.09.1955	geboren in Rotthof/Ndb. als Sohn des Landwirts Emil Dura und seiner Ehefrau Maria
1961 - 1966	Volksschule in Ruhstorf/Rott
1966 - 1975	Math./Naturw. Gymnasium Pocking
20.06.1975	Allgemeine Hochschulreife
1975 - 1976	Grundwehrdienst in Pocking
1976 - 1981	Studium der Tiermedizin an der Universität München
1981	verehelicht mit Eva Maria Dura
03.12.1981	Staatsexamen
1981 - 1982	Anfertigung der vorliegenden Disser- tation am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungs- physiologie der Tierärztlichen Fakul- tät der Ludwig-Maximilians-Universi- tät München

